

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia



**Avaliação da atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e de framboesa**

**Katy Esteves Dias**

Orientação: Professor Doutor Pedro Miguel Barata de Silva Coelho

Coorientação: Professora Doutora Maria Eduardo Figueira

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Dissertação

2016



Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia



**Avaliação da atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e de framboesa**

**Katy Esteves Dias**

Orientação: Professor Doutor Pedro Miguel Barata de Silva Coelho

Coorientação: Professora Doutora Maria Eduardo Figueira

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Dissertação

2016





## Resumo

Vários estudos têm evidenciado os efeitos benéficos de uma alimentação equilibrada, rica em hortofrutícolas, na redução do risco de desenvolvimento de doenças como as DCV, a diabetes e o cancro. Dos compostos presentes nestes alimentos, os polifenóis parecem ser os responsáveis por alguns destes efeitos. As bagas, denominação comumente usada para designar frutos pequenos de cor intensa, são particularmente ricas em compostos fenólicos. De entre as bagas, destacam-se, pela sua crescente produção nacional e presença no mercado, o mirtilo e a framboesa.

Por serem escassos os estudos que tenham avaliado os efeitos biológicos destas bagas (e dos seus componentes) em Portugal, a presente dissertação teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e framboesa de origem portuguesa.

Após a preparação dos extratos, avaliou-se a atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, a atividade antifúngica em três espécies de *Candida*, a capacidade de inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7, o efeito citotóxico em macrófagos e a capacidade de inibição da proliferação de linfócitos T e de duas linhas celulares de cancro de próstata.

Verificou-se uma ausência de atividade antibacteriana por parte de ambos os extratos e uma capacidade fungistática do extrato de framboesa a 100µg/mL em *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Ambos os extratos inibiram a produção de NO por macrófagos RAW 264.7 de uma maneira dose-dependente, com um IC<sub>50</sub>, em µg/mL, de 53,58 ± 7,21 para o mirtilo e de 44,36 ± 8,67, para a framboesa, sem efeitos citotóxicos. Também se verificou uma inibição dose-dependente da proliferação de linfócitos T, contudo sempre inferior a 30%, sem possibilitar o cálculo do IC<sub>50</sub>. O mesmo se verificou relativamente às linhas celulares de cancro de próstata, uma vez que, para ambas, a inibição por parte dos extratos não ultrapassou os 25%. De uma forma geral, os resultados foram mais pronunciados para o extrato de framboesa, o que pode ser explicado pelo maior teor de compostos fenólicos deste extrato relativamente ao de mirtilo (22,5µg EAG/mg e 18,7µg EAG/mg).

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que os compostos presentes nos mirtilos e framboesas testados têm um efeito imunomodulador, principalmente anti-inflamatório e, de uma forma menos pronunciada, de inibição da proliferação de linfócitos T. Relativamente aos efeitos em linhas celulares de cancro, os resultados parecem promissores, principalmente em relação à framboesa, uma vez que

mostrou inibir a proliferação das duas linhas celulares usadas. Quanto à atividade antimicrobiana, as concentrações testadas, significativamente inferiores às descritas na literatura, não permitiram verificar efeitos antibacterianos para ambos os extratos nem antifúngicos para o extrato de mirtilo.

Pode inferir-se que o uso de extratos em concentrações superiores às testadas ou a purificação dos mesmos em estudos futuros permitirá a obtenção de resultados mais significativos.

## Abstract

Several studies have demonstrated the positive effects of a balanced, rich in fruits and vegetables diet in the risk reduction and prevention of some diseases, such as CVD, diabetes and cancer. Phenolics seem to be the vegetable compounds responsible for some of the effects associated with these foods. Berries, a commonly used name to refer to small intense colourful fruits, are particularly rich in phenolic compounds. Among berries, bilberry and raspberry stand out because of the rise in the national production and availability of such berries.

Due to the lack of studies evaluating biological effects of these berries (and their compounds) in Portugal, this thesis aims to evaluate the antimicrobial, immunomodulatory and anticancer activity of extracts prepared with nationally produced bilberry and raspberry.

After preparing the extracts, the antibacterial activity in Gram-positive and Gram-negative bacteria, the antifungal activity in three *Candida* species, the inhibitory effect on RAW 264.7 macrophages NO production, the cytotoxic effect in macrophages and the proliferation inhibition of T cells and two prostate cancer cell lines were evaluated.

The raspberry extract demonstrated fungistatic capacity in *C. albicans* and *C. parapsilosis* at 100µg/mL. No antibacterial activity was shown with any of the extracts.

Both the extracts inhibited the RAW 264.7 macrophages NO production in a dose-dependent manner, with an  $IC_{50}$  of  $53,58 \pm 7,21\mu\text{g/mL}$  and  $44,36 \pm 8,67\mu\text{g/mL}$ , for the bilberry and raspberry extracts, respectively, without cytotoxic effects. A dose-dependent inhibition of T lymphocyte proliferation was also shown, with inhibition percentages always under 30%, thus making it impossible to determine the  $IC_{50}$ . The same was seen in relation to the prostatic cancer cell lines, since the extracts inhibited cells proliferation in less than 25%. In general, the results were more pronounced in terms of the raspberry extracts, which can be explained by the richest composition of this extract in phenolics in relation to the bilberry extract (22,5µg GAE/mg and 18,7µg GAE/mg).

Taken together, these results indicate that the bilberry and raspberry tested compounds have an immunomodulator effect, mainly anti-inflammatory and, in a less significant way, a T lymphocyte proliferation inhibition effect. In relation to the results obtained in cancer cell lines, these seem promising, especially in the case of raspberries, because of its inhibition of both the cancer cell lines

With regard to the antimicrobial activity, the extract concentrations used in this study were significantly lower than those described in the literature and didn't show antibacterial effects for either of them nor antifungal effects for the bilberry extract. It can be inferred that the use of higher extract concentrations or the purification of the extracts in future studies will lead to the emergence of more significant results.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a concretização desta dissertação de mestrado, nomeadamente

Ao Professor Doutor Pedro Miguel Barata de Silva Coelho, meu orientador, pelo acompanhamento ao longo de todo o trabalho e pelas valiosas sugestões e conselhos,

À Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, minha coorientadora, por ter sugerido e permitido a realização deste trabalho e pela sua constante prontidão em ajudar,

À Professora Doutora Fátima Cerqueira, pelo apoio e disponibilidade,

À Universidade Fernando Pessoa, na pessoa do Digníssimo Reitor Professor Doutor Salvato Trigo, por me ter permitido a execução do trabalho laboratorial nas suas instalações e pelas condições de trabalho que me proporcionou,

À Carla Gabriel, à Viviana Silva, à Jani Silva e à Beatriz Reis, colegas de trabalho no laboratório, pela ajuda e pelos bons momentos partilhados,

Ao Ricardo e aos demais técnicos, auxiliares e membros do FP-ENAS/CEBIMED, pela simpatia constante com que sempre me prestaram o apoio necessário,

À Professora Doutora Maria São José Nascimento, à Professora Doutora Amélia Sarmiento e ao Professor Doutor Rui Medeiros, pela cedência das linhas celulares, essenciais para a concretização dos objetivos deste trabalho,

À Tânia, à Mariana, à Stephanie, à Joana e à Marta, pela amizade e apoio,

Ao João, pelo apoio e ajuda constantes, que nunca me deixaram vacilar,

À minha família, pelo apoio incondicional.



# Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Índice	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
I. Introdução	1
1. Bagas e compostos fenólicos	2
1.1. Mirtilo	5
1.2. Framboesa	6
2. Resistência aos antimicrobianos	8
2.1. Resistência aos antibacterianos	8
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	10
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.2. Resistência aos antifúngicos	12
2.2.1. <i>Candida albicans</i>	13
2.2.2. <i>Candida krusei</i>	14
2.2.3. <i>Candida parapsilosis</i>	15
3. Sistema imunológico	17
3.1. Imunidade inata	17
3.1.1. Macrófagos	18
3.1.2. Óxido Nítrico (NO)	19
3.1.2.1. Óxido Nítrico e inflamação	20
3.1.2.2. Óxido Nítrico e stress oxidativo e nitrosativo	20
3.1.2.3. Óxido Nítrico e cancro	21
3.2. Imunidade adaptativa/adquirida	22
3.2.1. Linfócitos T	23
4. Cancro	25
4.1. Cancro da próstata	25
II. Objetivos	27
III. Materiais e métodos	29
IV. Resultados	39

V. Discussão	46
VI. Conclusão	59
VII. Referências bibliográficas	61



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Compostos fenólicos das bagas	4
<b>Figura 2</b> – Mirtilo europeu ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	6
<b>Figura 3</b> – Framboesa ( <i>Rubus idaeus</i> L.)	7
<b>Figura 4</b> – Tempo entre a descoberta de um antibiótico e a primeira resistência ao mesmo	9
<b>Figura 5</b> – <i>E. coli</i>	10
<b>Figura 6</b> – <i>S. aureus</i>	11
<b>Figura 7</b> – <i>P. aeruginosa</i>	12
<b>Figura 8</b> – <i>C. albicans</i>	14
<b>Figura 9</b> – <i>C. krusei</i>	14
<b>Figura 10</b> – <i>C. parapsilosis</i> (comparação com <i>C. albicans</i> )	15
<b>Figura 11</b> – Sistema imunológico humano	17
<b>Figura 12</b> – Polarização de macrófagos e seus efeitos	19
<b>Figura 13</b> – Efeito inibitório dos extratos na produção de NO por macrófagos RAW 264.7	41
<b>Figura 14</b> – Efeito inibitório do L-NAME e dexametasona (controles positivos) na produção de NO por macrófagos RAW 264.7	42
<b>Figura 15</b> – Efeito inibitório dos extratos na proliferação de células Jurkat	43
<b>Figura 16</b> – Efeito inibitório dos extratos na proliferação de células PC-3	44
<b>Figura 17</b> – Efeito inibitório dos extratos na proliferação de células LNCaP	45
<b>Figura 18</b> – Inibição da proliferação de PC-3 e LNCaP pela doxorrubicina (controle positivo)	45



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Teor de polifenóis de algumas bagas em mg/g de peso fresco	3
<b>Tabela 2</b> – Papel protumoral e tumoricida do NO	22
<b>Tabela 3</b> – Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de mirtilo e framboesa	40
<b>Tabela 4</b> – CMI dos extratos de mirtilo e framboesa em diferentes bactérias	40
<b>Tabela 5</b> – CMI dos extratos de mirtilo e framboesa em diferentes fungos	41



## Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
*C. albicans* – *Candida albicans*  
*C. krusei* – *Candida krusei*  
*C. parapsilosis* – *Candida parapsilosis*  
CAT – Catalase  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CMI – Concentração Mínima Inibitória  
CML – Concentração Mínima Letal  
COX – Cicloxigenase  
CYP – Citocromo P450  
DCV – Doenças cardiovasculares  
DM – *Diabetes mellitus*  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMF – N,N-dimetilformamida  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EAG – Equivalentes de Ácido Gálico  
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay  
eNOS – Síntase do Óxido Nítrico endotelial  
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
GPx – Peroxidase da glutationa  
GST – Glutathione-S-transferase  
IFN- $\gamma$  – Interferão-gama  
IL-1 – Interleucina-1  
IL-6 – Interleucina-6  
INE – Instituto Nacional de Estatística  
iNOS – Síntase do Óxido Nítrico indutível  
L-NAME – N-nitro-L-arginina metil éster  
LOX – Lipoxigenase  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MH II – Mueller-Hinton II  
MOPS – 3-(*N-morpholino*)propansulfonic acid  
MRSA – *S. aureus* resistente à metilina

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazóleo brometo  
NF-κB – Fator nuclear kappa B  
NK – Natural Killer  
NO – Óxido Nítrico  
NOS – Síntase do Óxido Nítrico  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBS – Tampão fosfato-salino  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PHA – Fitohemaglutinina  
PMA – Phorbol-12-miristato-13-acetato  
*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*  
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*  
*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*  
SBF – Soro Bovino Fetal  
SDA – Saboureaux Dextrose Agar  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SOD – Superóxido dismutase  
SPE – Extração em Fase Sólida  
TCR – Recetores de células T  
TLR – Recetores Toll-Like  
TNF-α – Fator de necrose tumoral  
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana  
VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina

## I. Introdução

## 1. Bagas e compostos fenólicos

Uma dieta rica em frutos e hortícolas, segundo vários autores, retarda o processo de envelhecimento e reduz a incidência de várias doenças, nomeadamente DCV (doenças cardiovasculares), neoplasias, doenças imunológicas como a artrite reumatóide, doenças pulmonares e doenças degenerativas, como a doença de Parkinson e de Alzheimer (1-6). Apesar de a maior parte dos mecanismos de ação não serem ainda conhecidos, estes têm sido frequentemente associados aos componentes destes alimentos, nomeadamente às fibras (7), às vitaminas C e E e a fitoquímicos presentes nestes alimentos, que têm propriedades antioxidantes (8).

Dentro dos frutos com marcada ação antioxidante podem destacar-se as bagas. As bagas são frutos pequenos de textura branda, geralmente com sementes incorporadas, de pequena dimensão. As bagas mais frequentemente ingeridas na dieta ocidental são o mirtilo, a framboesa, a groselha, o arando e o morango, e são geralmente consumidas na forma fresca, congelada, seca, em extratos ou, como acontece frequentemente, sob a forma de suplementos alimentares (9, 10), sendo exemplo o VitaCberry, da Angelini (11). Podem ainda ser usadas na produção de iogurtes, sumos, doces, geleias e gelados.

Estes frutos são compostos por fibras, ácidos gordos, minerais essenciais e vitaminas (vitamina C, vitaminas do complexo B e provitamina A) (12), assim como elevados níveis de uma diversidade de produtos fitoquímicos, maioritariamente representados por moléculas fenólicas (**Tabela 1**).

Estas moléculas são classificadas de acordo com as suas características estruturais em flavonóides (antocianinas, flavonóis e flavanóis), ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico), estilbenos, linhanos e taninos (12-16) (**Figura 1**).

Os polifenóis estão ubiquamente distribuídos no reino vegetal e são os metabolitos secundários mais abundantes nas plantas (17), sendo fundamentais para o seu normal crescimento e desenvolvimento, pela proteção que conferem face às condições ambientais desfavoráveis como o baixo aporte de água, as radiações UV, os danos físicos e as infeções por microrganismos de vários tipos (8, 18, 19). Conferem-lhes pigmentação (em particular as antocianinas), capacidade de dissuasão de insetos, de quelação de metais pesados e de inativação/*scavenging* dos radicais livres formados durante a fotossíntese (12). Têm um papel importante no conjunto de propriedades organoléticas dos frutos (20) e a sua concentração tende a ser mais elevada na parte mais exterior (8).



O teor em polifenóis varia com diferentes fatores, uns controláveis e outros incontroláveis pelo produtor. O teor varia com a espécie e variedade, a localização geográfica da plantação e as condições climáticas. Pode igualmente ser fortemente influenciado pelo processo de cultivo, grau de maturação aquando da colheita e pelas condições e o tempo de armazenamento dos frutos produzidos (8, 18).

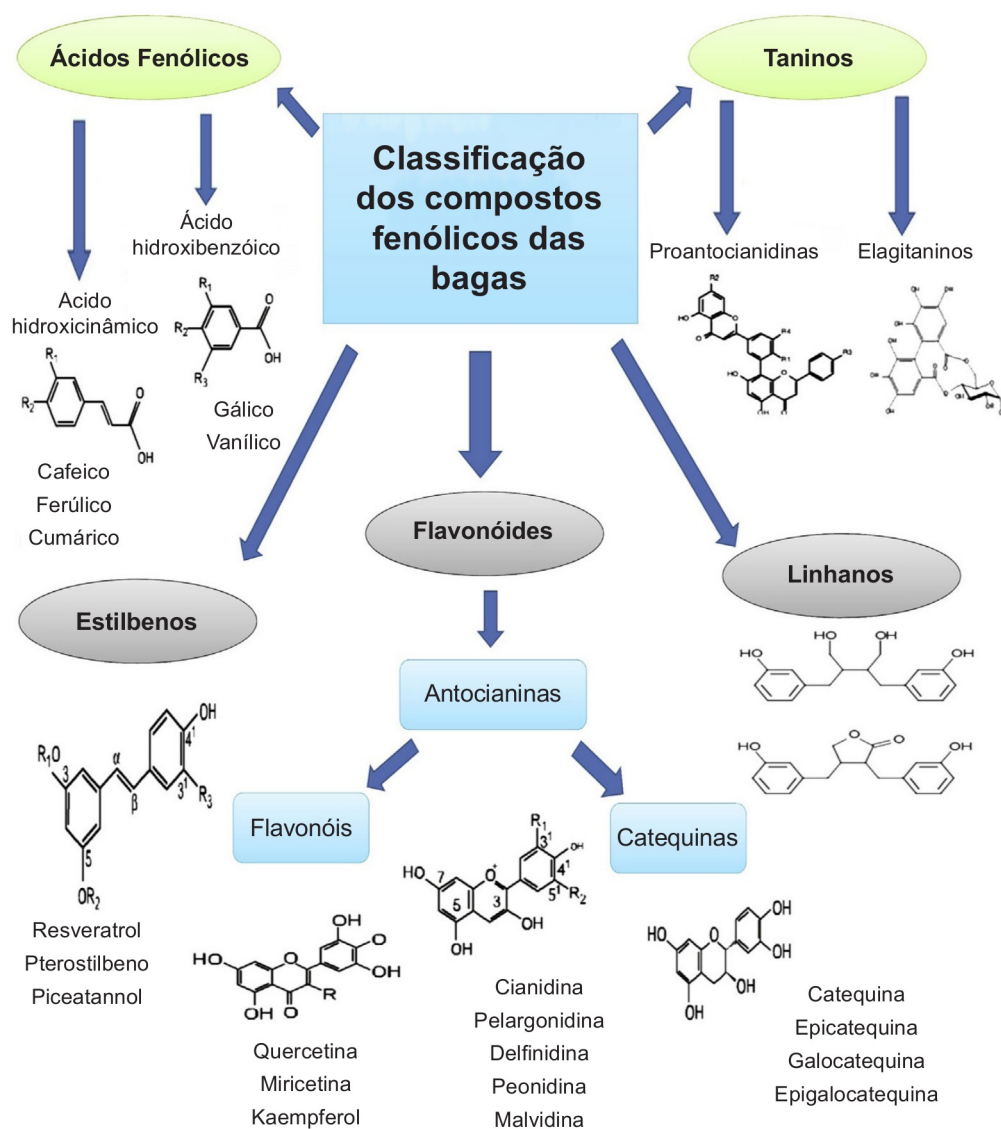
**Tabela 1:** Teor de polifenóis de algumas bagas em mg/g de peso fresco (Adaptado de (12))

Bagas	Flavonóides	Fenóis	Antocianinas	Bagas	Flavonóides	Fenóis	Antocianinas
 Mirtilo ( <i>Vaccinium spp.</i> )	50	261-585	25-495	 Mirtilo ( <i>Vaccinium myrtillus L.</i> )	44	525	300
 Amora	276	486	82-326	 Framboesa	6,0	121	99
 Arando	157	315	67-140	 Baga do sabugueiro	42	104	45-791

Está atualmente amplamente estabelecido que estes compostos trazem muitos benefícios à saúde humana e são reconhecidamente importantes numa alimentação equilibrada (4, 6, 21). As suas fortes propriedades **antioxidantes** têm sido muito estudadas, atuando de diferentes formas, tendencialmente sinérgicas, nomeadamente *scavenging* de espécies reativas de oxigénio (ERO) intracelulares, aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT) e da glutatona-S-transferase (GST), diminuição da atividade da síntase do óxido nítrico indutível (iNOS) e inibição de algumas isoformas do citocromo P450 (CYP) (8, 12, 16, 22, 23).

Os polifenóis apresentam ainda propriedades **antimutagénicas e antineoplásicas** - pela inibição da proliferação celular, da telomerase e do CYP1A1 humano e pela indução da apoptose (10, 12, 16, 22, 23) -, **antimicrobianas** - em *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) e *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA), entre outros (12) -, **anti-inflamatórias** - pela supressão da expressão da síntase do óxido nítrico indutível (iNOS), por inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), e pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) - (12, 16, 23), **de proteção das**

**células endoteliais e vasos sanguíneos** - por aumento da atividade da eNOS e indução da produção de NO, entre outros, tanto *in vitro* como *in vivo* (16) - assim como propriedades **neuroprotetoras** - redução da peroxidação lipídica, proteção dos neurónios dopaminérgicos, atenuação da expressão da cicloxigenase (COX)-2 e ativação do NF-kB - (12, 16, 22).



**Figura 1:** Compostos fenólicos das bagas (Adaptado de (12))

As atividades terapêuticas dos compostos fenólicos são reconhecidas desde há muitos anos, havendo relatos do seu uso enquanto medicamento natural para tratamento de doenças do foro circulatório, respiratório, digestivo e do trato urinário (8). Hoje em dia, pelas suas características físico-químicas, também os extratos de bagas, preparações concentradas, obtidas através de matéria-prima vegetal e cuja

preparação envolve um solvente (24), são utilizados para preparar formulações de suplementos alimentares e medicamentos (8, 12, 25), de que é exemplo o Daflon, da Servier (26).

Atualmente as bagas são muito associadas ao conceito de alimento funcional. São considerados como funcionais os alimentos que se demonstrou apresentarem efeito fisiológico benéfico para a saúde e/ou redução dos riscos de doenças crônicas, para além da função nutricional básica. O ingrediente funcional tem de permanecer no alimento e ter efeitos nas quantidades em que este é normalmente consumido na dieta, devendo sê-lo regularmente (27).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza a importância do consumo dos compostos bioativos, especialmente provenientes de pequenos frutos coloridos, na prevenção de problemas de saúde importantes, nomeadamente DCV, DM, neoplasias e inclusive a obesidade (20). Note-se que, tal como acontece com todos os nutrientes, um teor excessivo de compostos fenólicos numa dieta pode ter efeitos deletérios, nomeadamente na fisiopatologia do consumidor. É reconhecido que os taninos, por exemplo, podem diminuir a biodisponibilidade do ferro e da tiamina, bloquear enzimas digestivas e limitar a biodisponibilidade de proteínas, com as quais formam complexos insolúveis no trato gastrointestinal (8).

### 1.1. Mirtilo

O mirtilo europeu (*Vaccinium myrtillus* L.) é um fruto silvestre pequeno, de cor preta azulada, com muitas sementes no seu interior (28) – **Figura 2**. É comercializado sob a forma fresca, congelada ou desidratada, mas também em extratos, vendidos como suplementos alimentares, para além de ser ingrediente de uma variedade de produtos processados (28). Tem-se verificado uma crescente procura e produção desta baga, de acordo com dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) que publicou em 2015 um relatório em que se verifica um aumento na área de produção de mais de 200% (211 a 823 hectares) e um aumento na produção de quase 400 toneladas (1437 a 1824 toneladas), de 2012 a 2014 (29).

As espécies do género *Vaccinium* (*Vaccinium spp.*) são consideradas uma das melhores fontes potenciais de antioxidantes na dieta, devido à presença de flavonóides (quercetina, catequinas e, principalmente, antocianinas), taninos, elagitaninos, e ácidos fenólicos (18, 30-34). Na literatura podem encontrar-se valores totais de compostos fenólicos muito variáveis, entre 261 e 585mg por grama de massa de fruto fresco (8, 12). Este fruto é comumente promovido pelos efeitos que tem na prevenção de dislipidemias, diminuição da glicemia, propriedades

antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-neoplásicas (12, 22, 28) e na melhoria da acuidade visual (as antocianinas tendem a melhorar a elasticidade e a permeabilidade dos vasos capilares oculares, o que pode melhorar a visão noturna) (8).



**Figura 2:** Mirtilo europeu (*Vaccinium myrtillus* L.) (35)

## 1.2. Framboesa

A framboesa (*Rubus idaeus* L.) está entre as bagas mais consumidas no mundo, tanto na sua forma natural como em ingrediente noutros produtos alimentares, como doces, geleias, xaropes e vinhos (36). Cresce em arbustos e possui uma cor vermelha atrativa, estando largamente distribuída em todas as regiões temperadas da Europa, Ásia e América do Norte (17) – **Figura 3**. De acordo com o INE, a produção de framboesa tem aumentado em Portugal nos últimos anos, com um aumento na área de produção de 234 para 450 hectares e na quantidade produzida de 3091 para 4697 toneladas, entre 2012 e 2014 (29). Apesar deste incremento na produção, a Agriminho, empresa de consultoria do norte do país, refere que esta “ainda não foi suficiente para compensar o expressivo aumento do consumo nacional” (37)

A framboesa vermelha europeia, uma das três espécies mais importantes do mercado (38), é reconhecidamente uma boa fonte de compostos fenólicos, incluindo antocianinas e elagitaninos, assim como de minerais, vitaminas, carotenóides e ácidos orgânicos (39-41). O teor de compostos fenólicos desta baga é naturalmente muito variável, encontrando-se na literatura valores a oscilar entre

113,7mg e 714,7mg/100g de fruto (8, 17, 38, 42, 43). Uma vez que o potencial antioxidante da framboesa está diretamente relacionado com o seu teor total de compostos fenólicos (17, 43), a determinação da sua concentração em polifenóis pode servir para avaliar, ainda que indiretamente, os benefícios do seu consumo para a saúde (17). Vários autores têm atribuído à framboesa propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antimutagénicas e antimicrobianas (12, 22).



**Figura 3:** Framboesa (*Rubus idaeus* L.) (44)

## **2. Resistência aos antimicrobianos**

Define-se como resistência aos antimicrobianos a resistência de um microrganismo a um fármaco antibacteriano, antiparasitário, antivírico ou antifúngico que num período inicial era eficaz para o tratamento das infeções por ele causadas, o que resulta num tratamento difícil, custoso ou até mesmo impossível dos pacientes (45, 46). A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça crescente ao tratamento eficaz de uma variedade de infeções, sendo atualmente um verdadeiro problema de saúde pública. Para além das diretas implicações na saúde humana, esta “crise” afeta também a indústria alimentar, uma vez que há cada vez mais microrganismos, incluindo agentes patogénicos alimentares, que para além de serem resistentes a antimicrobianos, que são também são resistentes aos métodos de processamento e conservação de alimentos (47). Neste sentido, e uma vez que os conservantes alimentares de origem natural apresentam benefícios relativamente aos sintéticos, é importante o estudo de compostos presentes na natureza, para serem usados a nível industrial (47). Os compostos fenólicos podem ter um papel importante neste sentido, já que a sua diversidade estrutural lhes confere também diferenças na capacidade antimicrobiana contra microrganismos patogénicos (48).

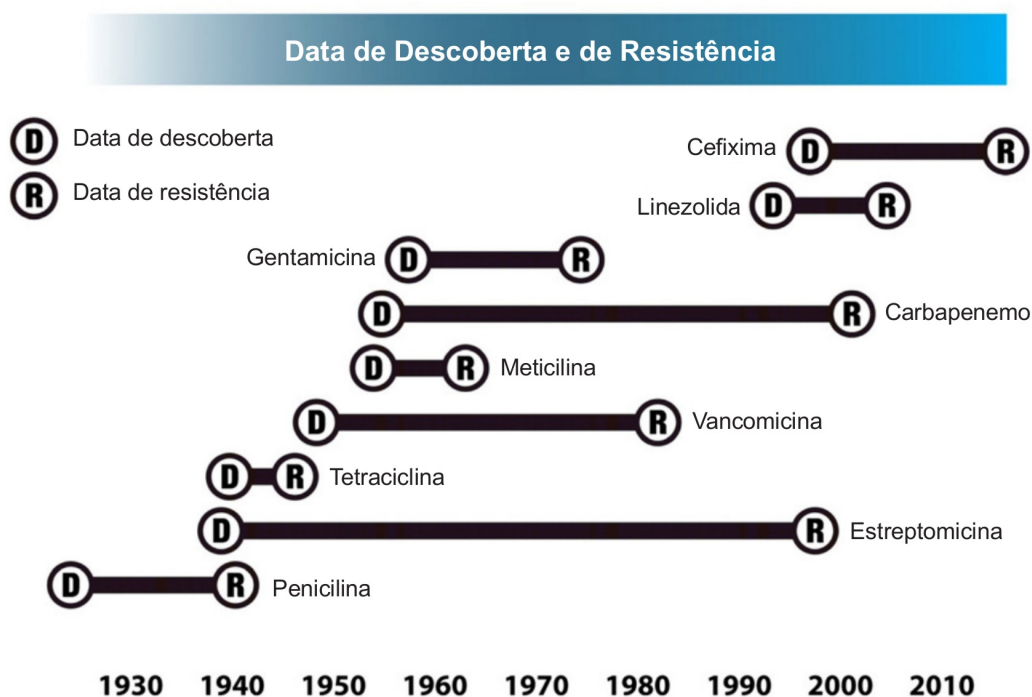
### **2.1. Resistência aos antibacterianos**

Os antibióticos são uma das armas mais importantes no combate às infeções bacterianas e têm beneficiado muito a qualidade de vida do Homem desde o seu aparecimento. Podem ser bacteriostáticos ou bactericidas, consoante inibam o crescimento de bactérias ou provoquem a sua morte, respetivamente (49, 50). De acordo com o seu modo de ação na célula bacteriana, os antibióticos são habitualmente agrupados em antibióticos parietais (inibem a síntese do peptidoglicano), antibióticos antimembranares (alteram a permeabilidade da membrana celular bacteriana), antibióticos inibidores da síntese proteica, Sulfonamidas e Trimetoprim (antimetabolitos que comprometem a viabilidade da célula bacteriana), Fluoroquinolonas (inibem a ação das topoisomerasas bacterianas), Ácido fusídico (inibe a síntese proteica) e Rifampicina (inibe a síntese de mRNA) (49).

Contudo, o seu uso excessivo e inapropriado ao longo das últimas décadas tem comprometido os seus efeitos, tendo surgido resistências bacterianas (51). Os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser organizados em quatro grupos (52):

- 1) codificação de enzimas que modificam ou inativam os antibióticos antes que eles possam ter algum efeito;
- 2) redução da quantidade de antibiótico que atinge o alvo, por impermeabilidade ou efluxo;
- 3) alteração do local-alvo dos antibióticos, modificando ou eliminando locais de ligação;
- 4) alteração de um passo metabólico.

A OMS declarou a resistência aos antibióticos como uma preocupação mundial, que se estende da segurança da saúde pública ao bem-estar económico e social (53). A resistência aos antibióticos não é um problema recente, contudo, o rápido aumento das estirpes resistentes, associado ao abrandamento no desenvolvimento de novos antibióticos, quebrou o equilíbrio que antes existia (**Figura 4**) (54-56), sendo atualmente um verdadeiro problema de saúde pública.



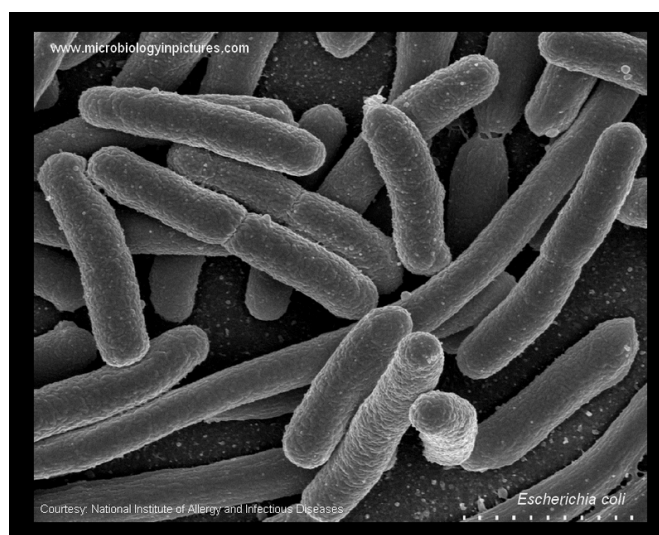
**Figura 4:** Tempo entre a descoberta de um antibiótico e a primeira resistência ao mesmo (Adaptado de (57))

O grupo dos principais microrganismos envolvidos no processo de resistência, chamados “Patogéneos ESKAPE”, pela sua capacidade de “escape” aos antibacterianos comuns, inclui *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Enterobacteriaceae*, família de bactérias Gram-negativo de que se destaca *Escherichia coli* (*E. coli*) (58).

Sem rápidas soluções para este problema, entramos numa “era pós-antibiótico”, na qual as infeções que outrora eram fatais voltarão a ameaçar as populações (56). Assim, torna-se importante o desenvolvimento de novos antibacterianos para contrariar esta tendência (59-61).

### 2.1.1. *Escherichia coli*

*E. coli* (**Figura 5**) é uma bactéria Gram-negativo, que faz parte da microflora normal do Homem e dos animais. Contudo, é também a causa mais frequente de infeções do trato urinário (contraídas na comunidade ou em ambiente hospitalar) e de bacteriémias em todas as idades, está associada a infeções intra-abdominais, dos tecidos moles e da pele, é causa de meningite em recém-nascidos e é um dos principais agentes de infeções alimentares a nível mundial (45).



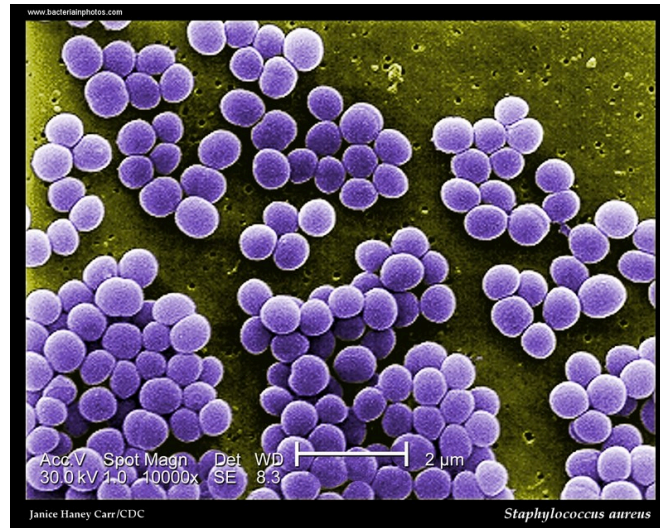
**Figura 5:** *E. coli* (62)

### 2.1.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* (**Figura 6**) é uma bactéria Gram-positivo que geralmente faz parte da flora habitual da pele e do nariz, sendo também reconhecidamente um dos agentes patogénicos humanos mais importantes. Pode causar uma variedade de infeções, principalmente cutâneas, dos tecidos moles e ósseo, assim como bacteriémias, sendo também a causa mais comum de infeções de feridas no pós-operatório (56). Algumas estirpes de *S. aureus* podem também ser responsáveis por intoxicações alimentares (45). O MRSA emergiu na década de 60, tendo-se disseminado de uma forma dramática, sendo hoje em dia muito prevalente em hospitais, principalmente



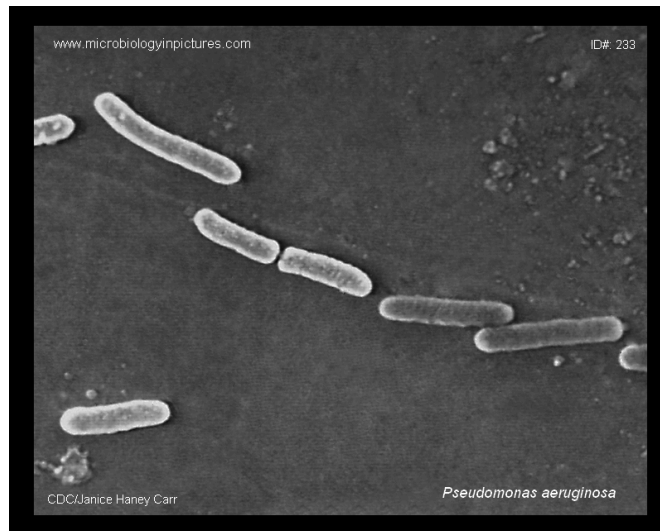
em unidades de queimados e unidades de cuidados intensivos (63). A OMS refere que os doentes com infecção por MRSA têm uma probabilidade 64% superior de morte, quando comparados a doentes com uma forma não-resistente desta infecção (46).



**Figura 6:** *S. aureus* (64)

### **2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* (**Figura 7**) é uma bactéria Gram-negativo ubiqüitária, que tende a crescer em ambientes húmidos. Está presente na água, nos solos, na microflora da pele dos animais e do Homem e nas fezes de doentes saudáveis. É um agente patogénico oportunista e raramente provoca infecção em pessoas saudáveis, podendo multiplicar-se rapidamente em pacientes imunocomprometidos. Nestes doentes, é responsável por 10% das infeções a nível hospitalar, sendo também a segunda causa mais frequente de infeções da pele em queimados (65, 66).



**Figura 7:** *P. aeruginosa* (67)

Alguns estudos têm mostrado efeitos antibacterianos de bagas (incluindo o mirtilo e a framboesa), assim como dos seus compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides e taninos (13, 68). Estes podem inibir as bactérias por destabilização ou permeabilização da membrana citoplasmática, por inibição de enzimas microbianas extracelulares, por ação direta no metabolismo microbiano ou ainda por privação de substratos necessários para o crescimento microbiano (12). Assim, as bagas, no seu todo ou sob a forma de extratos fenólicos derivados, podem ser consideradas compostos promissores para ajudar a ultrapassar problemas de resistência aos antibióticos (20).

## **2.2. Resistência aos antifúngicos**

As infeções fúngicas estão em ascensão, principalmente devido ao número crescente de doentes imunocomprometidos (69-71). As espécies do género *Candida* são a segunda causa mais frequente de infeções fúngicas a nível mundial (72) e a primeira causa de infeções fúngicas invasivas (73). Estes fungos são constituintes saprófitas da pele e mucosas do ser humano (69, 74). Contudo, algumas espécies como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, entre outros (72, 75), podem tornar-se agentes patogénicos oportunistas, seguindo uma transição de uma fase comensal para uma fase patogénica, induzida por alterações no hospedeiro (72). Assim, aproveitando um sistema imunitário local ou sistemicamente debilitado, espécies do género *Candida* podem proliferar e causar infeção, a chamada candidíase (72, 74). Esta infeção fúngica representa a quarta causa de infeções nosocomiais e pode ser classificada em três grupos principais: cutânea, mucocutânea (orofaríngea, esofágica e vulvovaginal) e sistémica (candidemia, entre outras) (72). A candidíase

mucocutânea é uma complicação frequente em doentes infetados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou com imunodeficiência combinada severa. Já a candidemia, associada a uma mortalidade de 15% a 35% (76), está relacionada com tratamentos médicos mais agressivos, sendo que doentes sob quimioterapia, terapia de imunossupressão, sujeitos a uma cirurgia major ou com um cateter venoso central são os mais predispostos (74). Apenas cinco espécies são responsáveis por 92% destas infeções: *C. albicans* (62% dos casos a nível mundial), *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (73).

Apesar de *C. albicans* ser a causa mais comum de doença, a prevalência de doenças causadas por espécies não-albicans tem aumentado nos últimos anos (69). Os fatores de risco para a ocorrência de uma candidíase dependem de cada espécie. No caso de neonatos, pessoas sujeitas a transplantes ou sob nutrição parentérica, o risco de infeção por *C. parapsilosis* é maior do que por qualquer outra espécie de *Candida*. Também se verificam diferenças a nível geográfico, sendo a prevalência de *C. albicans*, por exemplo, maior na Europa e América do Norte (69). Um dos principais fatores de virulência de *Candida spp.* é a sua flexibilidade e capacidade de se adaptar a ambientes diferentes, pela formação de biofilmes, que lhe confere proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e contra agentes antifúngicos. Relativamente à resistência de células em biofilmes, sabe-se que pode ser 1000 vezes superior à de células planctónicas (77).

Com o aumento das infeções fúngicas, surge também um aumento da resistência aos antifúngicos. Os azóis, as equinocandinas e os polienos são as três classes de medicamentos mais comumente prescritos em casos de infeções fúngicas sistémicas. A resistência dos fungos a estes fármacos é uma preocupação crescente, tendo já sido observada em todas as espécies de *Candida* clinicamente relevantes (69, 78).

### **2.2.1. *Candida albicans***

Das espécies do género *Candida*, *C. albicans* (**Figura 8**) está entre as mais prevalentes e as mais estudadas. É um fungo dimórfico, que pode existir sob a forma de levedura ou hifa (filamentosa) (79). Pode causar infeções superficiais assim como sistémicas, associadas a uma elevada mortalidade e morbilidade nos que sobrevivem (74, 79), sendo a causa mais comum de candidemias (78).

Como já referido, a patogenicidade do fungo depende do sistema imunológico do hospedeiro, sendo os doentes imunocomprometidos os mais suscetíveis. No

entanto, *C. albicans* pode também causar doença em indivíduos saudáveis, como é o caso, por exemplo, da candidíase vulvovaginal (74).



**Figura 8: *C. albicans* (80)**

### 2.2.2. *Candida krusei*

*C. krusei* (**Figura 9**) é um agente patogênico oportunista, especialmente em pacientes sujeitos a transplantes de medula óssea ou com neoplasias hematológicas (81). É responsável por 1 a 5% das candidemias, com uma taxa de mortalidade que pode variar entre 60 e 80% (81, 82). Este fungo é muitas vezes descrito como multirresistente, devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol e à sua diminuída suscetibilidade à flucitosina, anfotericina B e cetoconazol (81).

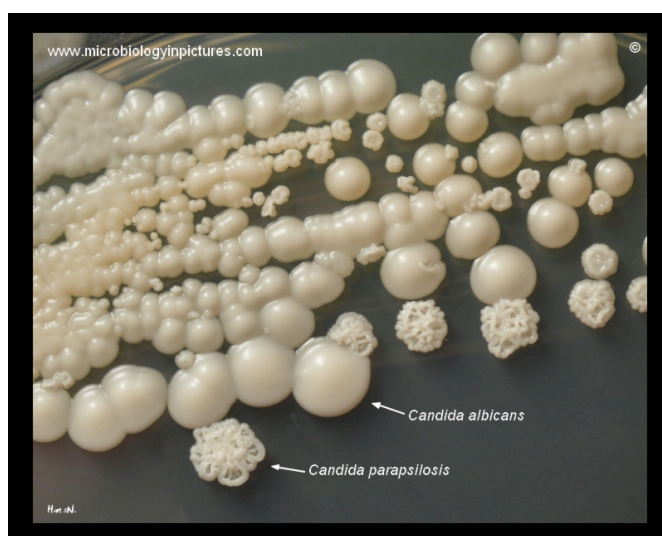


**Figura 9: *C. krusei* (83)**

### 2.2.3. *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* (Figura 10) é um comensal humano, geralmente isolado da pele das mãos (84, 85). É notório pela sua afinidade por cateteres e material prostético, assim como pela sua capacidade de crescimento em soluções de hiperalimentação e capacidade de formação de biofilmes (85).

Os fatores de risco de infecções por *C. parapsilosis* incluem cateterização vascular, uso prévio de antibióticos, terapia de imunossupressão prévia e neutropenia, entre outros (85). A prevalência de *C. parapsilosis* como agente patogénico humano emergente tem aumentado, sendo esta espécie responsável por cerca de 20% das candidemias na Europa, principalmente em neonatos críticos e pacientes cirúrgicos de unidades de cuidados intensivos, ocupando a segunda posição atrás de *C. albicans* (84, 86). Para além de ser responsável por infecções sistémicas, *C. parapsilosis* tem também emergido como causa importante de onicomicoses (84).



**Figura 10:** *C. parapsilosis* (comparação com *C. albicans*) (87)

Pelo exposto, urge a pesquisa de novos compostos com atividade antifúngica, que possam prevenir ou reverter situações de infeção por fungos. Uma vez que a síntese de novas moléculas químicas pode acarretar efeitos secundários e problemas de toxicidade, é importante a pesquisa de compostos naturais. Neste sentido, vários investigadores se têm debruçado sobre o efeito que as plantas e seus compostos fenólicos derivados têm no crescimento de fungos (88).

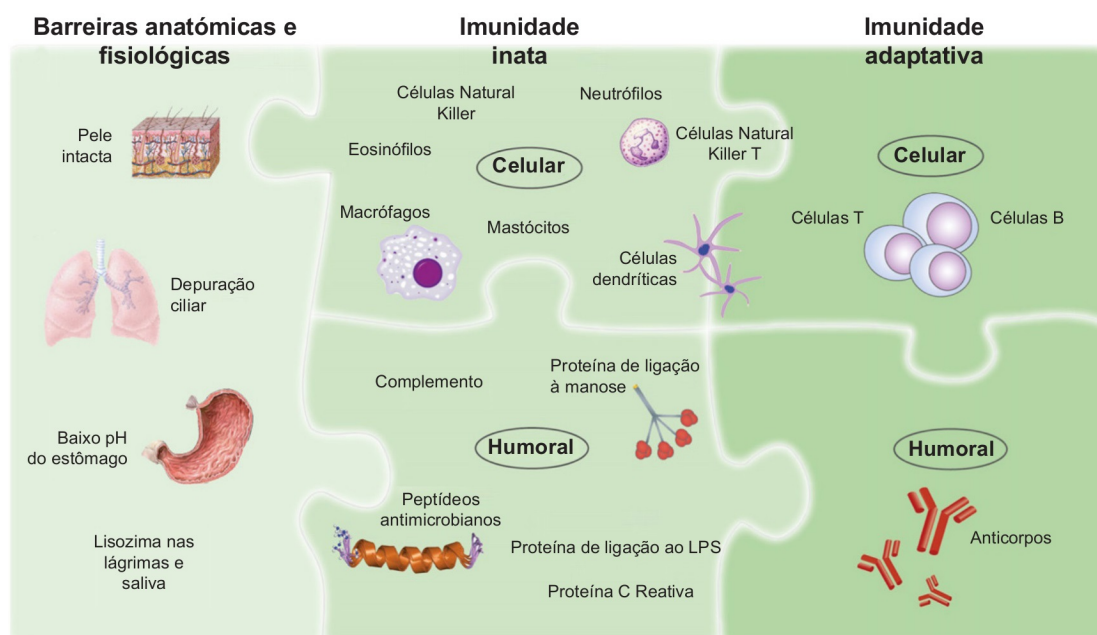
Relativamente ao efeito antifúngico das bagas, a maioria dos estudos existentes descreve o efeito do arando em infeções do trato urinário provocadas por estirpes de

*Candida* (89-91), estando também descritos efeitos antifúngicos do mirtilo e da framboesa (92, 93).

### 3. Sistema imunológico

O sistema imunológico é um conjunto de células, tecidos e órgãos que trabalha de forma coordenada para defender o corpo das agressões de vários microrganismos estranhos e toxinas, por forma a assegurar a homeostasia. Compreende mecanismos de imunidade inata, mais geral e imediata, e adaptativa, mais complexa e tardia (94, 95). Em cada uma destas respostas estão envolvidas células específicas, assim como elementos humorais (95). Para além destas duas categorias, as barreiras anatómicas e fisiológicas podem ser consideradas como um primeiro nível de defesa (**Figura 11**) (96).

Apesar desta divisão da resposta imunitária, existe uma interdependência entre a imunidade inata e adaptativa, agindo ambas de uma forma complementar (96).



**Figura 11:** Sistema imunológico humano (Adaptado de (96)).

#### 3.1. Imunidade inata

A imunidade inata consiste no primeiro mecanismo de defesa contra agentes estranhos e nefastos ao organismo. Este tipo de resposta está presente tanto em vertebrados como em invertebrados e plantas e não é específico a nenhum agente patogénico, reconhecendo características partilhadas por grupos destes (97).

Fazem parte do sistema imunitário inato células hematopoiéticas como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células Natural Killer (NK), mas também células não hematopoiéticas, como as células epiteliais que cobrem os

tratos respiratório, gastrointestinal e urinário (95). Estas células exprimem à superfície Recetores Toll-like (TLR), que reconhecem padrões associados a agentes patogénicos (98). Podem reconhecer, entre outros, vírus, bactérias e fungos, não tendo, contudo, capacidade de distinção entre diferentes estirpes (99). Dado estas moléculas estarem amplamente expressas num grande número de células, este sistema está preparado para uma resposta rápida a agentes agressores (94, 96), desencadeando geralmente um processo inflamatório (99).

As células do sistema inato são importantes para a ativação da imunidade adaptativa (99). São responsáveis pelo processamento de antígenos e pela apresentação destes aos linfócitos nos nódulos linfáticos (99).

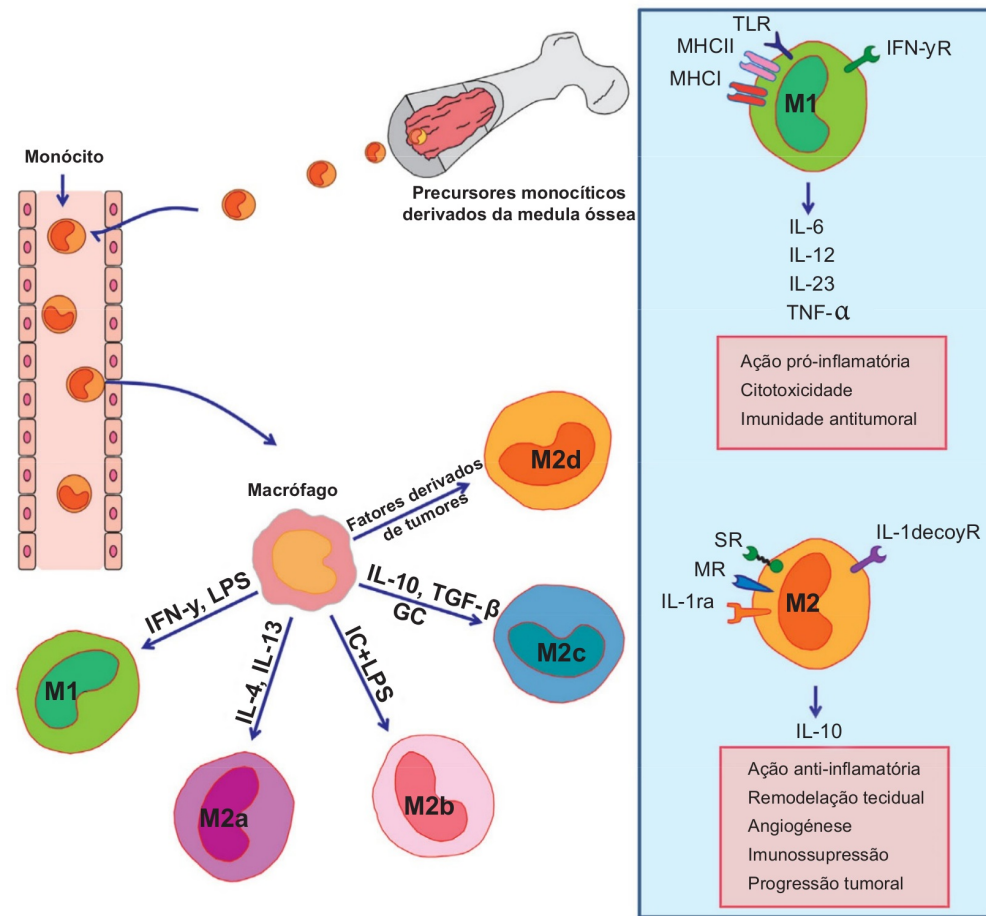
### **3.1.1. Macrófagos**

Quando um agente patogénico invade um tecido humano, as primeiras células efectoras do sistema imune que encontra são os macrófagos (100).

Os macrófagos são células do sistema imunitário inato que se diferenciam a partir de precursores monocíticos da medula óssea e que têm um extenso papel na defesa do hospedeiro e na homeostase dos tecidos. Têm um tempo de vida prolongado e concentram-se tanto em tecidos inflamados como em tecidos sãos (98). As principais funções dos monócitos e macrófagos são o reconhecimento de agentes patogénicos estranhos por interação com as suas estruturas superficiais, a proliferação, a produção de citocinas e quimiocinas e a fagocitose (101). Os monócitos extravasam para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos maduros. Depois de diferenciados, podem distinguir-se os macrófagos M1 (ativados pela via clássica) e os macrófagos M2 (ativados pela via alternativa), variação fenotípica consequência do microambiente envolvente, que resulta em efeitos antagónicos, de acordo com as substâncias libertadas (**Figura 12**) (102). O lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo, leva a uma ativação dos macrófagos pela via clássica (95) e estimula-os a produzirem de forma exacerbada citocinas pró-inflamatórias e NO (98, 103).

Estas substâncias, nomeadamente o NO, são altamente tóxicas para microrganismos, podendo também causar um fenómeno de inflamação exacerbada, acreditando-se hoje em dia que os macrófagos M1 participam em várias doenças inflamatórias crónicas e autoimunes, como a doença de Crohn, a artrite reumatóide e a esclerose múltipla (104, 105). Assim, torna-se importante o controlo das respostas dos macrófagos M1, por forma a prevenir danos colaterais a tecidos do hospedeiro (104).





**Figura 12:** Polarização de macrófagos e seus efeitos (Adaptado de (102))

### 3.1.2. Óxido Nítrico (NO)

O NO, produzido por macrófagos humanos (98, 104, 106), é um dos mediadores celulares de processos fisiológicos, como a manutenção da pressão arterial, a comunicação neuronal e a inflamação, e patológicos, como a diabetes, a artrite e a inflamação crônica (105, 107).

É sintetizado a partir da L-arginina pela família da Síntase do Óxido Nítrico (NOS), que inclui as isoformas endotelial (eNOS/NOS3), neuronal (nNOS/NOS1) e indutível (iNOS/NOS2) (106). A eNOS e a nNOS são chamadas de constitutivas, uma vez que são continuamente expressas em células endoteliais e neuronais, respetivamente. Dependem de uma elevação da concentração de cálcio tecidual para a sua atividade, produzindo assim quantidades baixas e transitórias de NO. Ao contrário das isoformas constitutivas, a iNOS é uma isoforma que necessita de ser induzida e que é independente do cálcio (105). É expressa em células dendríticas, células NK, e macrófagos (105) e pode ser induzida por estímulos imunológicos,

virtualmente em todas as células mamíferas (108, 109), o que resulta numa produção contínua de NO. Apesar de quantidades moderadas de NO produzido pela eNOS e pela nNOS serem essenciais para a manutenção da homeostase, o aumento significativo da síntese de NO pela iNOS desencadeia um processo inflamatório (108). O NF- $\kappa$ B leva à ativação desta enzima inflamatória (110). Trata-se de um fator de transcrição pró-inflamatório, ubiquitário nas células eucarióticas, que existe no citoplasma num estado inativo e que se transloca para o núcleo quando ativado (110-112). Quando está no núcleo, induz a transcrição de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandina  $E_2$  (PGE $_2$ ), NO, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), em resposta a estímulos patológicos (113).

#### **3.1.2.1. Óxido Nítrico e Inflamação**

A inflamação é essencial para proteger o organismo contra agentes patogénicos ou células perigosas. Trata-se de uma reação auto-limitada da microcirculação que é caracterizada pelo movimento de proteínas séricas e leucócitos do sangue para os tecidos extra-vasculares (108). Um processo inflamatório normal tem a duração de alguns dias, a denominada inflamação aguda. Contudo, uma regulação anormal deste processo pode resultar num processo inflamatório contínuo, prolongado no tempo, a inflamação crónica, que tem como consequências a destruição de células ou a desregulação do metabolismo destas (113). Muitos estudos referem que a inflamação crónica é uma causa subjacente a várias doenças como as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, o cancro e a diabetes (108, 113-115). Deste modo, os compostos que sejam capazes de suprimir a ativação do NF- $\kappa$ B ou de inibir enzimas como a iNOS, podem atuar como agentes anti-inflamatórios.

A atividade anti-inflamatória dos polifenóis, descrita na literatura, baseia-se em mecanismos como a inibição de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2, a lipoxigenase (LOX) e a iNOS, a inibição do NF- $\kappa$ B, a ativação de enzimas de fase II e a modulação de vários genes reguladores do ciclo celular e da sobrevivência das células (108, 110, 116, 117).

#### **3.1.2.2. Óxido Nítrico e Stress oxidativo e nitrosativo**

As células aeróbias produzem espécies reativas de oxigénio e de azoto, como o radical superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogénio (H $_2$ O $_2$ ), o radical hidroxilo (OH $^{\cdot}$ ), o NO e o peroxinitrito (ONOO $^{\cdot-}$ ), em consequência do seu normal metabolismo (118).

Quando presente nos tecidos em grande quantidade, o NO, por interação com o radical superóxido ( $O_2^-$ ), forma peroxinitrito, altamente reativo tanto como agente oxidante como nitrosante (109, 112). Para manter estas substâncias num nível fisiológico, o organismo conta com defesas antioxidantes endógenas, como a CAT, a SOD e a peroxidase da glutathione (GPx) (118). Outros meios de defesa podem ser supridos pela dieta, através dos antioxidantes presentes nos alimentos, de que são exemplo os ácidos fenólicos, os flavonóides, os estilbenos e os taninos (16, 112, 119).

Quando a produção de espécies reativas é superior à capacidade do organismo em eliminá-las, entra-se num desequilíbrio, o stress oxidativo e nitrosativo (118). Nestas condições, as espécies reativas podem causar danos ao ácido desoxirribonucleico (ADN), a proteínas ou a lípidos (112, 118) e modular processos como a apoptose (120). O stress oxidativo e nitrosativo é denominador comum de várias doenças como o cancro, as DCV e a depressão (118, 121).

### **3.1.2.3. Óxido Nítrico e Cancro**

O NO tem também um papel a nível dos processos neoplásicos.

Dados da literatura, maioritariamente de estudos *in vitro*, indicam efeitos duais desta molécula. Pode, por um lado, promover o crescimento e proliferação de tumores ou, por outro, ter efeito tumoricida (**Tabela 2**) (109, 122, 123). É a concentração de NO, o tipo de célula exposta, o estado redox e a duração da exposição que ditam se há um efeito inibitório ou estimulador do processo neoplásico. Já depois da iniciação do cancro, o NO parece ter um papel protumoral, dado que as concentrações necessárias para se verificar uma citotoxicidade não se atingem em células cancerígenas (109).

**Tabela 2:** Papel protumoral e tumoricida do NO (Adaptado de (109))

Papel do NO	Mecanismos de ação do NO	
Mecanismos de genotoxicidade	Formação de espécies tóxicas e mutagênicas	<b>Papel de promoção tumoral</b>
	Modificação direta do ADN - quebras na cadeia, oxidação e desaminação de ácidos nucleicos	
	Inibição dos sistemas de reparação do ADN	
Efeitos anti-apoptóticos	Mutações no gene p53 - perda da sua atividade supressora	
	Inibição direta da atividade da caspase	
	Inibição da libertação do citocromo C	
	Aumento da expressão no Bcl-2	
	Supressão da produção de ceramida	
	Ativação da ciclooxigenase	
Indução e promoção da angiogénese (iNOS e eNOS)	Dilatação vascular pela eNOS	
	Libertação de VEGF e estimulação da hiperpermeabilidade do endotélio vascular pelo NO	
	Aumento da produção de PGE2, resultando num aumento da permeabilidade da vasculatura tumoral	<b>Papel tumoricida</b>
	Ativação da COX-2, que estimula a produção de fatores pro-angiogénicos e prostaglandinas	
Limitação da resposta imune do hospedeiro contra os tumores	Supressão da proliferação e infiltração de leucócitos	
	Baixa interação leucócito-endotélio	
Promoção de metástases	Promoção da linfangiogénese e da propagação para os nódulos linfáticos, provavelmente pelo envolvimento do VEGF-C	
	Sobrerregulação do MMP-2 e -9	
	Subregulação do TIMP-2 e -3	
Efeito citotóxico e/ou citostático em células tumorais	Supressão da respiração celular e alteração do metabolismo do ferro	<b>Papel tumoricida</b>
	Supressão da síntese do ADN	
	Modulação pró-apoptótica pela ativação das proteases da família das caspases, sobreexpressão do gene p53 e alteração na expressão de proteínas associadas à apoptose	

### 3.2. Imunidade adaptativa/adquirida

A imunidade adaptativa toma esta denominação porque se adapta às nuances do agente patogénico responsável pela infeção em curso (100). Os efetores desta resposta são os linfócitos B e T, que têm como função destruir agentes patogénicos invasores e moléculas produzidas por eles (95). São ambos produzidos na medula óssea, sendo que as células B atingem a maturidade neste órgão, ao passo que as células T deixam a medula óssea num estado imaturo e migram para o timo, onde completam o seu desenvolvimento (100). Estas células possuem recetores à superfície, as imunoglobulinas ou recetores das células B (BCR) e os recetores das células T (TCR), respetivamente, que têm capacidade de reconhecer antígenos específicos, ao contrário do que acontece na imunidade inata (99, 100). Uma vez que na imunidade adquirida o número de células efectoras específicas para cada

antígeno é pequeno, é necessária uma proliferação destas células para se obter uma resposta eficaz (94). Assim, quando recebem sinais da imunidade inata, os linfócitos com receptores específicos para o agente patogénico são ativados, proliferam e diferenciam-se em linfócitos efetores (99, 100). A resposta pode ser mediada por anticorpos, produzidos por células plasmáticas diferenciadas a partir de linfócitos B, ou por células, no caso dos linfócitos T (100). Na resposta mediada por células, os linfócitos T reagem rapidamente contra um antígeno estranho que lhes é apresentado à superfície de uma célula do hospedeiro, ou produzem moléculas de sinalização que ativam macrófagos para destruírem o micróbio invasor (99, 124). Alguns dos linfócitos selecionados durante uma resposta imune adaptativa persistem no organismo, sendo capazes de atuar de forma rápida e eficaz num segundo encontro com o mesmo antígeno. Esta característica da imunidade adaptativa tem a denominação de memória imunológica (100, 125).

### **3.2.1. Linfócitos T**

As células ou linfócitos T são responsáveis por múltiplas funções, incluindo a morte de células infetadas e a ativação ou recrutamento de outras células imunitárias.

São divididas em duas grandes categorias, as células T CD8<sup>+</sup> e as células T CD4<sup>+</sup>, de acordo com as proteínas que expressam à sua superfície (98, 99, 106).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, ou linfócitos T citotóxicos, são essenciais para a remoção de células infetadas por vírus e células cancerígenas. Possuem grânulos que contêm citotoxinas, capazes de causar a apoptose.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem ser subdivididos em T Helper e T Reguladores (126). Dentro do grupo T Helper existem os TH1, TH2 e TH17. As células TH1 coordenam a resposta imune contra micróbios intracelulares, especialmente bactérias, produzindo e secretando, para tal, moléculas que ativam outras células do sistema imune (98); os linfócitos TH2 coordenam respostas imunes contra agentes patogénicos extracelulares como helmintas, alertando células B, granulócitos e mastócitos (98, 106, 126); as células TH17 produzem interleucina 17, uma molécula de sinalização que ativa células imunes e não-imunes; as células T reguladoras monitorizam e inibem a atividade de outras células T (98).

As células T são o principal mediador das doenças mediadas pelo sistema imune, estando descrita a sua estreita relação com a artrite reumatóide, a DM tipo 1 e a colite (127).

O sistema imunitário tem um papel importante na prevenção e controlo de muitas doenças. A maioria dos distúrbios imunológicos resulta de uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada ou de um ataque autoimune (98, 128). Como exemplos de doenças desencadeadas por estas anomalias da resposta imune temos a asma, as alergias ou a doença de Crohn, no primeiro caso, e a DM tipo 1, a artrite reumatóide ou a esclerose múltipla, no segundo (126, 129).

Por forma a controlar estas doenças com componente imunológica, é possível a modulação do sistema imune, ou seja, a indução, expressão, amplificação ou inibição de uma parte ou fase da resposta imunológica (130).

Os imunomoduladores são substâncias naturais ou sintéticas que ajudam a regular ou normalizar o sistema imunitário, seja por imunossupressão ou por imunoestimulação (125, 130). A descoberta de compostos moduladores do sistema imunológico que possam influenciar as respostas indesejáveis deste sistema constitui uma importante área de investigação. Os imunomoduladores naturais, apesar de serem menos eficazes que os sintéticos, causam também menos efeitos secundários (125), sendo uma alternativa às opções convencionais para várias doenças (130). Os flavonóides são exemplos promissores de compostos moduladores do sistema imune, pela sua capacidade de inibição da proliferação de células mononucleares de sangue periférico ou da produção de NO por macrófagos RAW 264.7 (130).

#### **4. Cancro**

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo. Estima-se que em 2012 tenham ocorrido 14,1 milhões de casos desta doença e que 8,2 milhões de mortes tenham ocorrido no mundo (131). É esperado que até 2032 o número de casos atinja os 22 milhões (132).

Mais de 30% dos cancros humanos poderiam ser prevenidos com modificações da dieta. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de uma dieta rica em fitoquímicos, que inclua fruta e hortícolas, contribui para a redução do risco de certos tipos de cancro no Homem (2, 5). Compostos fitoquímicos como os compostos fenólicos podem exercer efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos, maioritariamente devido aos seus efeitos duais no estado redox das células. Parecem promover uma ação antioxidante na prevenção da carcinogénese, e atuar como pró-oxidantes em células neoplásicas (133).

Dados da literatura indicam que os compostos fenólicos de bagas têm atividade em diferentes aspetos do processo neoplásico, como na redução da proliferação e na indução da apoptose em células cancerígenas (134), efeitos estudados em linhas celulares de cancro de próstata, mama, cólon, cérvix e boca (135). As antocianinas, por exemplo, apresentam efeitos antineoplásicos pela indução de enzimas metabolizadoras e modulação da expressão genética, por efeitos na proliferação celular, apoptose e etapas de sinalização subcelular e pela sua ação antioxidante, anti-angiogénica, anti-inflamatória, antiestrogénica e antimutagénica (12, 28, 34, 119, 136-140).

Uma vez que a maioria das terapias medicamentosas anticancerígenas são tóxicas e têm graves efeitos secundários, a pesquisa de produtos naturais com propriedades quimiopreventivas sem efeitos deletérios é preponderante (120, 141).

##### **4.1. Cancro da próstata**

O cancro da próstata é o cancro com maior incidência no homem, a nível europeu, sendo o terceiro mais mortal a seguir ao do pulmão e colorretal (142, 143). É geralmente diagnosticado em homens com mais de 50 anos, normalmente em estados avançados da doença (144).

No tecido prostático normal, os androgénios regulam o crescimento e diferenciação das células epiteliais. Em estádios precoces do cancro da próstata, os androgénios aumentam a proliferação celular, sendo este o alvo de muitas terapias, quer pela diminuição dos androgénios circulantes, quer pelo bloqueio dos seus recetores

(145). Num estágio mais avançado da doença, o crescimento e desenvolvimento celulares tornam-se normalmente refratários ao efeito dos androgénios e as células passam a crescer de forma desmesurada (146, 147).

Várias substâncias derivadas de plantas, como o licopeno, têm sido estudadas no sentido de serem usadas como terapêutica no cancro da próstata, pela atenuação do desenvolvimento ou da proliferação do mesmo (146). Por entre as substâncias naturais estudadas, também os compostos bioativos de bagas têm merecido a atenção de alguns investigadores. Estudos *in vitro* têm evidenciado a capacidade de polifenóis de bagas em reduzir a proliferação e induzir a apoptose em linhas celulares de cancro da próstata (135, 144, 148), havendo também indicação do potencial de redução do tamanho de tumores em estudos *in vivo* (148).



## II. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral testar a capacidade antimicrobiana, imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e de framboesa.

Com base nestes extratos, os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Quantificar o teor de compostos fenólicos totais;
  - a) a atividade antibacteriana em *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*;
  - b) a atividade antifúngica em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*;
2. Avaliar a atividade imunomoduladora, nomeadamente:
  - a) a capacidade de inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7;
  - b) a viabilidade de macrófagos RAW 264.7;
  - c) a capacidade de *scavenging* do NO produzido por macrófagos RAW 264.7;
  - d) a viabilidade de macrófagos derivados de células THP-1;
  - e) a capacidade de inibição da proliferação de linfócitos T;
3. Investigar a atividade anticancerígena, designadamente:
  - a) a capacidade de inibição da proliferação da linha celular de cancro de próstata PC-3, hormono-resistente;
  - b) a capacidade de inibição da proliferação da linha celular de cancro de próstata LNCaP, hormono-sensível.

### III. Materiais e métodos

## 1. Reagentes

A acetona e o etanol, usados na preparação dos extratos, foram adquiridos da Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido), tendo o metanol sido adquirido da Labsco GmbH & Co. KG (Hessen, Alemanha).

Os meios Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Mueller-Hinton Broth (MHII), assim como o agar bacteriológico, foram adquiridos da Liofilchem (Rosetto degli Abruzzi, Itália).

Os reagentes usados nas culturas celulares, incluindo os meios RPMI-1640, DMEM e o Soro Bovino Fetal (SBF), foram adquiridos da Gibco Invitrogen Co. (Barcelona, Espanha). O 2-Mercaptoetanol foi adquirido da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA), a glutamina e o dimetilsulfóxido (DMSO) da Applichem (Darmstadt, Alemanha) e a N,N-Dimetilformamida (DMF) da Spectramol Science Incorporated (Burlington, EUA). Todos os outros reagentes de grau analítico usados nos ensaios foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim am Albuch, Alemanha).

## 2. Preparação dos extratos fenólicos

**2.1. Framboesa:** Pesou-se uma quantidade excedente de amostra previamente armazenada a uma temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  e triturou-se num liquidificador de cozinha; pesou-se 40g do triturado e juntou-se 90mL de solução extractante, composta por metanol e acetona (50:50, v/v), e dividiu-se por 6 tubos de Falcon; vortexou-se durante 10-15 minutos e centrifugou-se durante 20 minutos (700rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ); filtrou-se o conteúdo dos tubos e guardou-se o filtrado num matraz, ao abrigo da luz. Fez-se nova extração do precipitado resultante e juntaram-se os dois filtrados, que foram evaporados no Rotavapor durante cerca de 40 minutos. Repetiu-se esta operação, tendo-se obtido um volume final de extrato de 11mL. O extrato obtido foi armazenado no frigorífico, a uma temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ . Foi depois liofilizado e dissolvido em DMSO (solução *stock*), para a realização dos ensaios.

**2.2. Mirtilo:** Pesou-se uma quantidade excedente de amostra previamente armazenada a uma temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  e triturou-se num liquidificador de cozinha; pesou-se 20g do triturado e acrescentou-se 50mL de solução extractante, composta por etanol e água (60:40, v/v), e dividiu-se por 5 tubos de Falcon; submeteu-se a um banho de ultrassons a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e centrifugou-se depois durante 15 minutos (6000rpm,  $20^{\circ}\text{C}$ ); juntaram-se os sobrenadantes e extraíram-se novamente os precipitados, como indicado. Juntou-se o filtrado das duas extracções e

evaporou-se no Rotavapor durante cerca de 40 minutos. Repetiu-se esta operação, tendo-se obtido um volume final de extrato de 16,9mL. O extrato foi depois liofilizado e dissolvido em DMSO (solução *stock*) para a realização dos ensaios.

### **3. Quantificação do teor de compostos fenólicos totais**

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método de Folin-Ciocalteu (149), de acordo com o descrito por Mazur SP e colaboradores (39). Resumidamente, misturou-se os extratos, devidamente dissolvidos (0,2mL), com reagente de Folin-Ciocalteu (1mL) e incubou-se por 3 minutos, antes da adição de carbonato de sódio a 7,5% (0,8mL). Incubou-se a mistura por 60 minutos, a temperatura ambiente, antes da medição da absorvância a 765nm, usando como padrão o ácido gálico. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em µg de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por mg de extrato liofilizado.

### **4. Atividade antimicrobiana**

#### **4.1. Atividade antibacteriana**

Para a avaliação da atividade antibacteriana usaram-se as bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), pertencentes à coleção do CEBIMED da Universidade Fernando Pessoa. Foram mantidas a -70°C e repicadas em meio MH II, mantendo-se as culturas a 4°C.

Determinou-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI) utilizando o método de microdiluição em caldo, de acordo com a norma do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M7-A6 (150). Diluíram-se as soluções *stock* dos compostos em meio MHII, de modo a obter concentrações seriadas de 1:2 (de 100µg/mL a 12,5µg/mL). Ajustou-se a concentração das bactérias (culturas com 24h de crescimento) por forma a que cada poço contivesse  $1 \times 10^4$  –  $5 \times 10^4$  UFC/mL de meio de cultura. Adicionaram-se os compostos aos microrganismos e incubaram-se as placas numa estufa a 37°C durante 24h. Passado este tempo, procedeu-se à leitura visual dos resultados, tendo-se definido a CMI como a concentração mais baixa em que não se obteve crescimento microbiano (ausência de turvação).

Incluiu-se em todas as experiências o controlo positivo (bactéria + meio de cultura, 100% de crescimento), o controlo negativo (meio de cultura, 0% de crescimento) e o controlo do composto (composto em meio de cultura).

## 4.2. Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica usaram-se as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209), pertencentes à coleção do CEBIMED da Universidade Fernando Pessoa. Foram mantidas a -70°C e repicadas em meio SDA, mantendo-se as culturas a 4°C.

Determinou-se a CMI através do método de microdiluição em caldo, de acordo com a norma do CLSI M27-A3 (151). Diluíram-se as soluções *stock* dos compostos em meio RPMI-1640 suplementado com 3-(*N-morpholino*)propansulfonic acid (MOPS), de modo a obter concentrações seriadas de 1:2 (de 100µg/mL a 12,5µg/mL). Ajustou-se a concentração das leveduras (culturas com 24h de crescimento) de forma a que cada poço contivesse  $0,5 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^3$  UFC/mL de meio de cultura. Adicionaram-se os compostos aos microrganismos e incubaram-se as placas numa estufa a 37°C durante 48 horas, após as quais se procedeu à leitura visual dos resultados, avaliando-se a presença de turvação (crescimento) ou ausência total desta.

Incluiu-se o controlo positivo (levedura + meio de cultura, 100% de crescimento), o controlo negativo (meio de cultura, 0% de crescimento) e o controlo do composto (composto em meio de cultura). Definiu-se a CMI como a concentração mais baixa em que não se obteve crescimento microbiano por deteção visual.

### 4.2.1. Efeito fungistático/fungicida dos compostos

A determinação da Concentração Mínima Letal (CML) baseou-se na técnica previamente descrita pelos grupos de Cantón (152) e Cavaleiro (153). Resumidamente, após a leitura da CMI, homogeneizou-se o conteúdo dos poços correspondentes à CMI e às concentrações superiores, retirou-se 25µL da suspensão celular de cada poço e inoculou-se numa placa de SDA. Incubou-se a placa numa estufa a 37°C durante 24 horas, tendo-se definido os compostos, nas concentrações usadas, como fungicidas ou fungistáticos, consoante a sua capacidade de inibir ou não o crescimento das leveduras, respetivamente, por deteção visual.

## **5. Atividade imunomoduladora**

### **5.1. Macrófagos RAW 264.7**

Usou-se a linha celular de macrófagos de murino RAW 264.7. Estas células foram mantidas em caixas de 75cm<sup>2</sup> com meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1µL/mL de gentamicina a 37°C numa estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Fizeram-se subculturas celulares a cada 2 ou 3 dias por raspagem e usaram-se as células para os ensaios numa fase de crescimento exponencial.

#### **5.1.1. Produção de NO por macrófagos RAW 264.7**

O efeito dos compostos na produção de NO foi determinado pela medição do nitrito (formado pela oxidação espontânea do NO) libertado nos sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS, usando o reagente de Griess (154), como previamente descrito (155, 156).

Plaquarem-se as células numa microplaca de 96 poços a uma concentração final de  $1 \times 10^6$  células/mL, deixando-as aderir por um período de 2 horas a 37°C numa estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Removeram-se os sobrenadantes e adicionou-se 100µL de uma solução de lipopolissacarídeo (LPS) a 1,5µg/mL, por forma a induzir a síntese de NO pelos macrófagos. Trataram-se as células com 100µL de diferentes concentrações dos compostos obtidas por diluições 1:2 (de 100µg/mL a 12,5µg/mL) e incubaram-se por 24 horas na mesma estufa. Posteriormente, transferiu-se 100µL de sobrenadante, livre de células, para uma nova microplaca, adicionando-se 100µL de reagente de Griess (partes iguais de uma solução de 1% p/v sulfanilamida em 5% v/v ácido fosfórico e de uma solução de 0,1% p/v naftiletilenodiamida em água desionizada), tendo-se quantificado a produção de nitrito após uma incubação de 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Quantificou-se a produção de nitrito por espectrofotometria a 545nm Vs. 630nm num leitor ELISA STAT FAX 3200. Usaram-se N-nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME), inibidor da atividade da iNOS (157), e dexametasona, inibidor da expressão da iNOS (158), como controlos positivos. Mediu-se a inibição da produção de NO por comparação das percentagens em células tratadas e não tratadas.

#### **5.1.2. Viabilidade de macrófagos RAW 264.7**

Avaliou-se a viabilidade de macrófagos usando o método colorimétrico de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazóleo brometo (MTT), sugerido pela primeira vez por Mosmann (159) e descrito posteriormente (155), que mede a habilidade de células viáveis reduzirem o MTT, com consequente produção de cristais de formazano, de cor azul/púrpura intensa, solubilizados com uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)/N,N-dimetilformamida (DMF). Quando as células morrem, perdem a capacidade de converter o MTT em formazano, pelo que a formação de cor serve como um marcador das células viáveis (160). Assim, é um método frequentemente usado para medir viabilidade celular (159, 161, 162).

Usou-se a primeira microplaca descrita no ensaio anterior. Passadas as 24h de incubação, e após se terem retirado os sobrenadantes, adicionou-se a cada poço 25µL de uma solução de MTT a 20%. Incubou-se novamente a placa na estufa por um período de 4h, após o qual se adicionou 50µL de uma solução de SDS/DMF (20% de SDS numa solução a 50% de DMF). A placa foi novamente incubada por um período não inferior a 6 horas, após o qual foi lida por espectrofotometria a 545nm Vs. 630nm num leitor ELISA STAT FAX 3200. Considerou-se a existência de toxicidade pelos compostos quando a viabilidade das células foi inferior a 70% (156).

#### **5.1.3. Scavenging do NO produzido por macrófagos RAW 264.7**

O *scavenging* do radical NO foi estimado com recurso à reação de Griess, anteriormente descrita (155, 156). A decomposição de nitroprussiato de sódio em meio aquoso (pH 7,2) leva à produção de NO, que reage com o oxigénio para formar nitrato e nitrito, quantificados pelo reagente de Griess. Os compostos com capacidade de *scavenging* do NO competem com o oxigénio, com consequente redução da formação de nitrito.

Fizeram-se as diluições dos compostos numa mistura de etanol/tampão fosfato-salino (PBS) (1:9) e colocou-se 50µL de cada diluição em 3 poços de uma microplaca; nos dois primeiros poços acrescentou-se 50µL de nitroprussiato de sódio dissolvido em PBS e na terceira coluna 50µL de PBS. Incluiu-se o controlo positivo (nitroprussiato de sódio – 100% de produção) e o controlo negativo (PBS – 0% de produção). Incubou-se a placa por 150 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passado este tempo, adicionou-se 100µL de solução de Griess a cada poço e incubou-se a placa por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Procedeu-se depois à leitura da placa num leitor ELISA STAT FAX 3200 a 545nm Vs. 630nm. Considerou-se existir *scavenging* do NO por parte dos



compostos testados sempre que a percentagem de nitrito formado na presença destes foi inferior a 70%, relativamente ao controlo positivo (156).

## **5.2. Células THP-1**

A linha celular THP-1 é uma linha celular de leucemia monocítica humana comumente usada para estimar a modulação da atividade de monócitos e macrófagos (163). Foi isolada a partir de sangue periférico de um rapaz de 1 ano de idade com leucemia monocítica aguda (101).

Estas células foram mantidas em caixas de 25cm<sup>2</sup> com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, 0,05mM de 2-Mercaptoetanol e 1µL/mL de gentamicina, a 37°C, numa estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Fizeram-se subculturas celulares a cada dois dias, passando para novas caixas suspensão celular numa proporção de 1:20 (0,5mL de suspensão para 10mL de meio).

### **5.2.1. Viabilidade de células THP-1 estimuladas com LPS e PHA**

Para testar o efeito dos extratos na viabilidade das células THP-1, colocou-se 50µL de suspensão celular, com concentração ajustada a  $1 \times 10^5$  células/mL, e 50µL de uma solução de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (10ng/mL), capaz de diferenciar os monócitos em macrófagos, em todos os poços de uma microplaca de 96 poços, que se incubou numa estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Passado 72 horas, retiraram-se os sobrenadantes dos poços e adicionou-se 100µL de meio de cultura às células aderidas. Incubou-se a microplaca por mais 24 horas, por forma a restabelecer o estado M0 aos macrófagos. No dia seguinte aspiraram-se novamente os sobrenadantes e adicionou-se 200µL de meio de cultura aos poços do controlo negativo e 100µL de uma solução de LPS (1µg/mL) ou de fitohemaglutinina (PHA) (10µg/mL) aos restantes poços; adicionou-se ainda 100µL de meio de cultura aos poços do controlo positivo e 100µL das diferentes concentrações dos extratos nos remanescentes. Incubou-se novamente a microplaca por um período de 48 horas. De seguida, retiraram-se os sobrenadantes dos poços e juntou-se 100µL de meio de cultura a todos, procedendo-se ao ensaio colorimétrico MTT, atrás definido. Considerou-se existir toxicidade dos compostos para as células quando a viabilidade das células tratadas em relação à das não tratadas foi inferior a 70% (156).

## **5.3. Células Jurkat**

A linha celular Jurkat foi isolada em 1970 a partir de linfócitos T de sangue periférico de um rapaz de 14 anos com leucemia linfoblástica aguda T (164). É fenotipicamente semelhante a linfócitos T humanos e tem sido muito usada para o estudo da fisiologia destas células (165-167).

As células Jurkat foram mantidas em caixas de 25cm<sup>2</sup> com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e 1µL/mL de gentamicina a 37°C numa estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Fizeram-se subculturas celulares a cada três ou quatro dias, por passagem de conteúdo para uma nova caixa, com a adição de meio de cultura.

### **5.3.1. Proliferação de células Jurkat**

Avaliou-se a proliferação de linfócitos Jurkat usando o método colorimétrico de redução do MTT, que, para além de ser usado para medir a viabilidade celular, é-o também para medir proliferação de células (159, 161, 162).

Numa microplaca de 96 poços adicionou-se 100µL de diferentes concentrações dos compostos (diluições 1:2) e 100µL de suspensão celular com uma concentração ajustada a  $1 \times 10^6$  células/mL. Incluiu-se o controlo positivo (células + meio de cultura, 100% de proliferação), o controlo negativo (meio de cultura, 0% de proliferação) e o controlo de cada composto (composto + meio de cultura). Incubou-se a microplaca a 37°C, numa estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Passadas 48 horas, centrifugou-se a microplaca durante 5 minutos (1200 rpm, 25°C) e rejeitou-se 100µL de sobrenadante de cada poço. Adicionou-se 25µL de uma solução de MTT a 20% e incubou-se novamente a placa na estufa por um período de 4h, após o qual se adicionou 50µL de uma solução de SDS/DMF (20% de SDS numa solução a 50% de DMF). A placa foi novamente incubada por um período não inferior a 6 horas, após o qual foi lida por espectrofotometria a 545nm Vs. 630nm num leitor ELISA STAT FAX 3200. Mediu-se a percentagem de inibição da proliferação de células Jurkat, por comparação das células tratadas com as não tratadas.

## **6. Atividade anticancerígena**

### **6.1. Linhas celulares de cancro de próstata: PC-3 e LNCaP**

Usaram-se duas linhas celulares de cancro de próstata: PC-3, hormono-resistente, e LNCaP, hormono-sensível.

As células PC-3 foram inicialmente isoladas de metástases ósseas de um paciente com 62 anos de idade com adenocarcinoma da próstata. Não respondem a

androgénios, glicocorticóides, ao fator de crescimento epidérmico ou ao fator de crescimento fibroblástico (168).

A linha celular LNCaP provém de uma lesão metastática de um adenocarcinoma da próstata. Foi isolada de um paciente com 50 anos de idade, em 1977. Trata-se de um modelo celular hormono-sensível, que contém recetores para estrogénios e androgénios (169), crescendo sob estímulo destes (146).

As células foram mantidas em caixas de 25cm<sup>2</sup> com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e 1µL/mL de gentamicina numa estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Fizeram-se subculturas celulares por tripsinização a cada três ou quatro dias, consoante a confluência celular.

## **6.2. Proliferação de PC-3 e LNCaP**

Para avaliar a proliferação de ambas as linhas celulares em presença dos compostos procedeu-se ao ensaio colorimétrico de redução do MTT, comumente usado para avaliar agentes anticancerígenos (170).

Ajustou-se a concentração da suspensão celular a  $1,5 \times 10^5$  células/mL e  $2 \times 10^5$  células/mL, para o ensaio com PC-3 e LNCaP, respetivamente. Adicionou-se 100µL de suspensão aos poços de uma microplaca correspondentes ao controlo positivo e ao teste. Incubou-se a microplaca numa estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Passado este tempo, retiraram-se os sobrenadantes e adicionou-se 100µL de meio de cultura aos poços do controlo negativo e positivo e 100µL das diferentes diluições dos compostos aos restantes. Voltou a incubar-se a microplaca, por um período de 48 horas, depois do qual se procedeu à adição de MTT e SDS/DMF, como já explicado. Mediu-se a percentagem de inibição da proliferação de PC-3 e LNCaP, por comparação das células tratadas com as não tratadas.

## **7. Análise Estatística**

O tratamento estatístico dos resultados foi feito no software Microsoft® Office Excel.



#### IV. Resultados

## 1. Quantificação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi de 18,7µg EAG/mg e de 22,5µg EAG/mg nos extratos liofilizados de mirtilo e de framboesa, respectivamente (**Tabela 3**). Verifica-se assim que o extrato de framboesa apresentou uma concentração em polifenóis 20% superior à do extrato de mirtilo.

**Tabela 3:** Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de mirtilo e framboesa

Extrato	Fenóis totais (µg/mg)
Mirtilo	18,7
Framboesa	22,5

Resultados apresentados em EAG – Equivalentes de Ácido Gálico.

## 2. Atividade antimicrobiana

### 2.1. Atividade antibacteriana

Testou-se a capacidade antibacteriana dos extratos a concentrações de 100µg/mL e inferiores, não se tendo verificado efeito de inibição do crescimento de qualquer bactéria (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** CMI dos extratos de mirtilo e framboesa em diferentes bactérias

Extrato	CMI (µg/mL)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25299	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Mirtilo	>100	>100	>100
Framboesa	>100	>100	>100

CMI - Concentração Mínima Inibitória. Os resultados correspondem a 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.

### 2.2. Atividade antifúngica

A avaliação da capacidade antifúngica dos extratos revelou uma ausência de efeito por parte do extrato de mirtilo e um efeito inibitório no crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis* pelo extrato de framboesa, a uma concentração de 100µg/mL (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** CMI dos extratos de mirtilo e framboesa em diferentes fungos

Extrato	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Mirtilo	>100	>100	>100
Framboesa	100	100	$\geq 100$

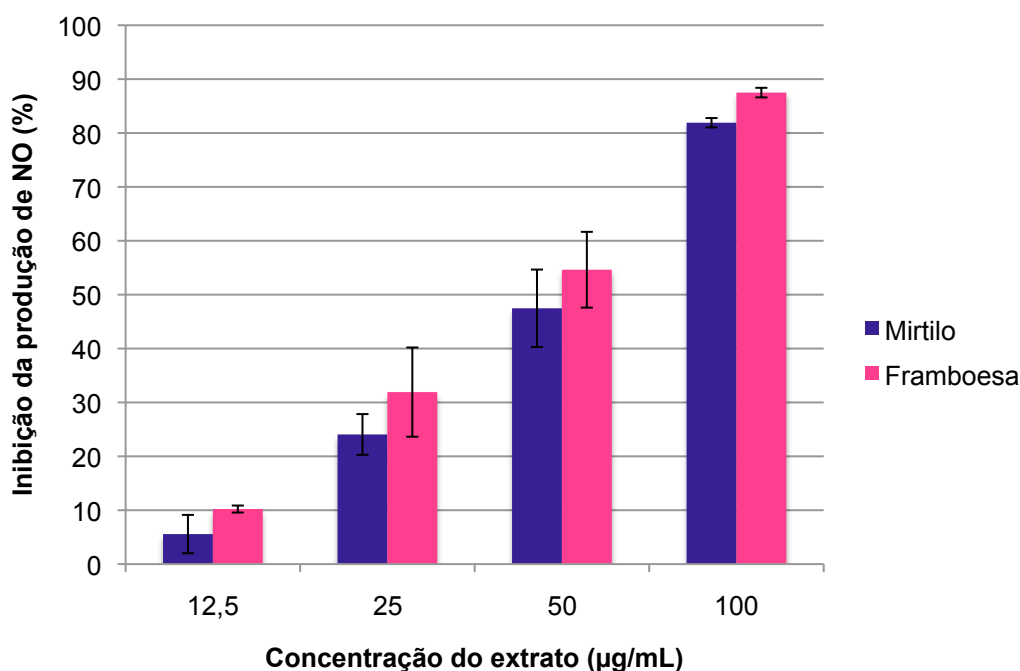
CMI - Concentração Mínima Inibitória. Os resultados correspondem a 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.

A investigação da CMI revelou que, a uma concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ , o extrato de framboesa tem ação fungistática para *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

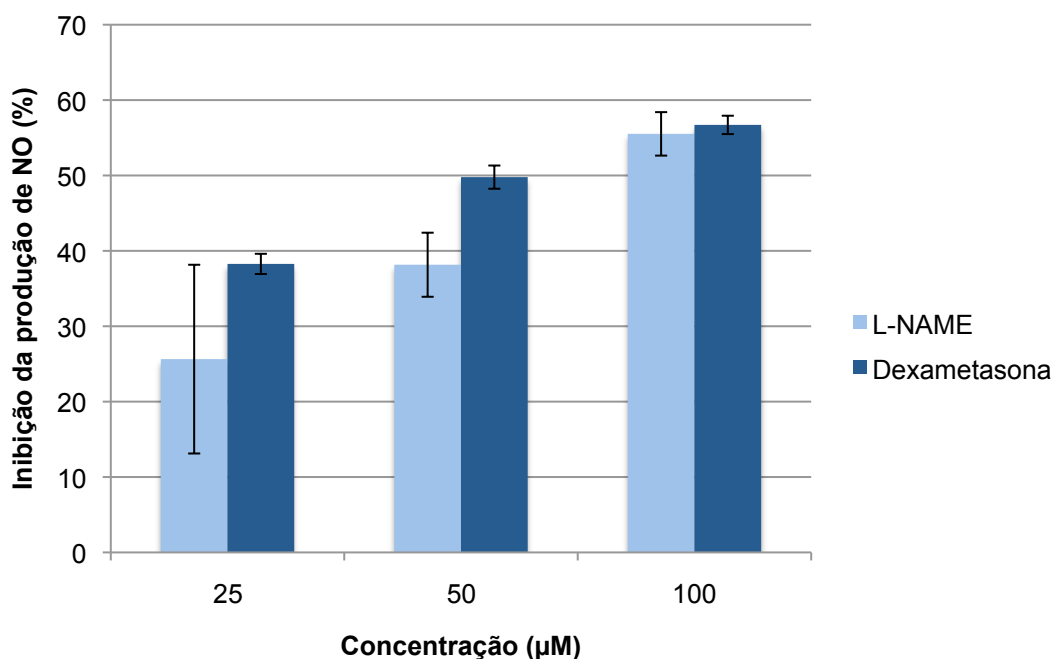
### 3. Atividade imunomoduladora

#### 3.1. Efeitos na produção de NO por macrófagos RAW 264.7

Apresentam-se abaixo os resultados da inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, tratados com os extratos de mirtilo e framboesa (**Figura 13**) ou com dexametasona e L-NAME (**Figura 14**).



**Figura 13:** Efeito inibitório dos extratos na produção de NO por macrófagos RAW 264.7. Os resultados referem-se à média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.



**Figura 14:** Efeito inibitório do L-NAME e dexametasona (controles positivos) na produção de NO por macrófagos RAW 264.7. Os resultados referem-se à média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.

Verificou-se uma inibição dose-dependente da produção de NO para ambos os extratos, com uma inibição inferior a 10% a uma concentração de 12,5µg/mL, e de cerca de 80% a uma concentração de 100µg/mL. Em todas as concentrações testadas, o extrato de framboesa mostrou um efeito inibitório ligeiramente superior ao do extrato de mirtilo. Por forma a excluir um eventual efeito de morte celular, procedeu-se ao ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular, tendo-se verificado uma viabilidade dos macrófagos muito próxima de 100% para todas as concentrações de extrato usadas (resultados não apresentados).

### 3.2. Scavenging do NO produzido por macrófagos RAW 264.7

A diminuição da concentração de NO nas culturas com macrófagos RAW 264.7, anteriormente apresentada, pode ter sido consequência de uma inibição da produção de NO ou do *scavenging* da molécula pelos compostos testados, após a sua produção. Assim, por forma a esclarecer qual o mecanismo que justificou a diminuição de NO, avaliou-se a capacidade de *scavenging* pelos extratos de mirtilo e framboesa através da adição do reagente de Griess. Fizeram-se três ensaios independentes e constatou-se uma ausência de efeito (% de nitrito formado superior



a 70% em relação ao controlo positivo) por ambos os extratos (dados não apresentados).

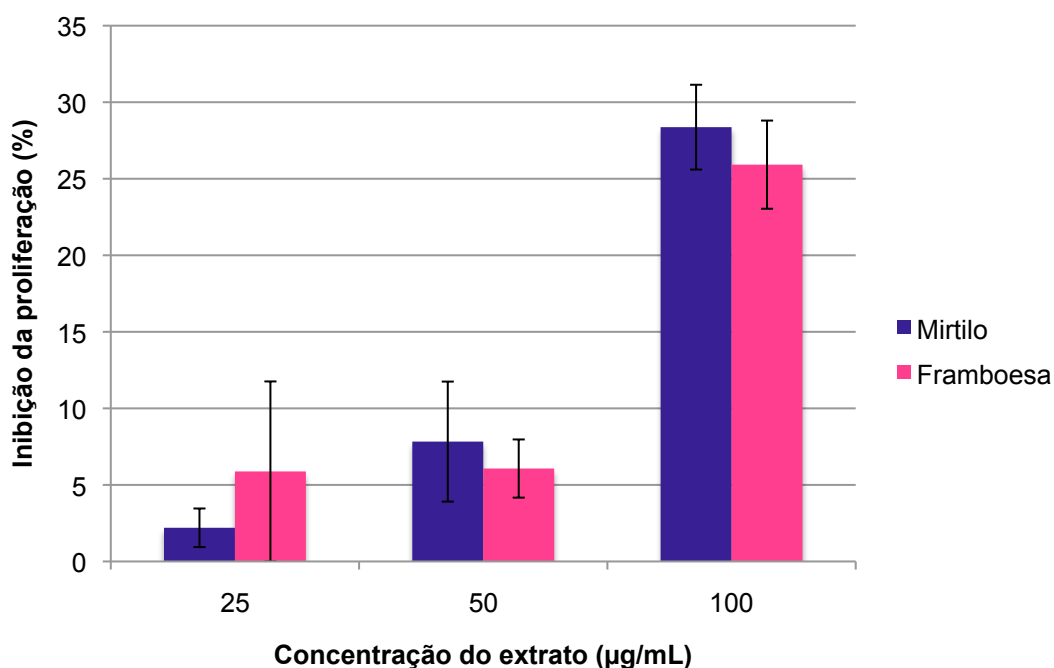
### 3.3. Viabilidade de macrófagos derivados de THP-1

Para investigar a toxicidade dos extratos para macrófagos derivados de células THP-1, procedeu-se ao ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular.

Nos dois ensaios realizados, as células, estimuladas com LPS ou PHA, tratadas com os extratos, apresentaram sempre uma viabilidade superior a 70% (dados não apresentados), pelo que se concluiu não existir toxicidade dos extratos para as células, em concentrações  $\leq 100\mu\text{g/mL}$ .

### 3.4. Inibição da proliferação de células Jurkat

Por forma a testar o efeito dos extratos na proliferação de linfócitos T, procedeu-se ao ensaio de MTT para determinação da proliferação celular. Apesar de os valores obtidos não terem permitido a determinação do  $\text{IC}_{50}$ , verificou-se que ambos os extratos inibiram a proliferação da linha celular Jurkat de uma forma dose-dependente (**Figura 15**). A uma concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ , a inibição pelos extratos de mirtilo e framboesa foi superior a 25%.



**Figura 15:** Efeito inibitório dos extratos na proliferação de células Jurkat. Os resultados referem-se à média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.

## 4. Atividade anticancerígena

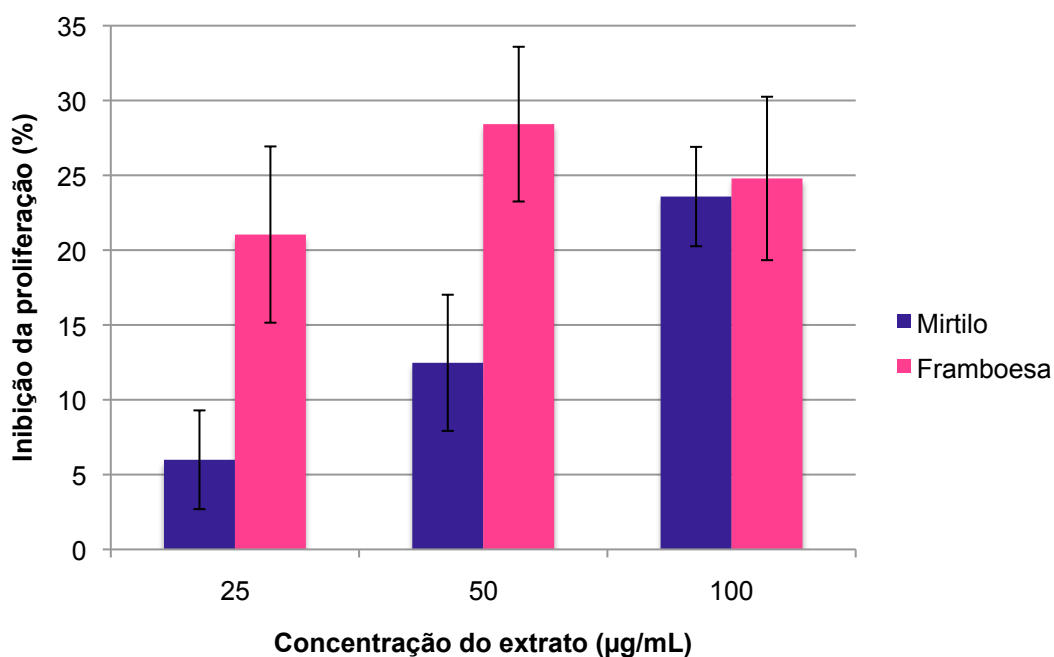
### 4.1. Inibição da proliferação de PC-3 e LNCaP

O estudo do efeito dos extratos em linhas celulares de cancro de próstata foi feito recorrendo ao ensaio de MTT para avaliação da proliferação celular.

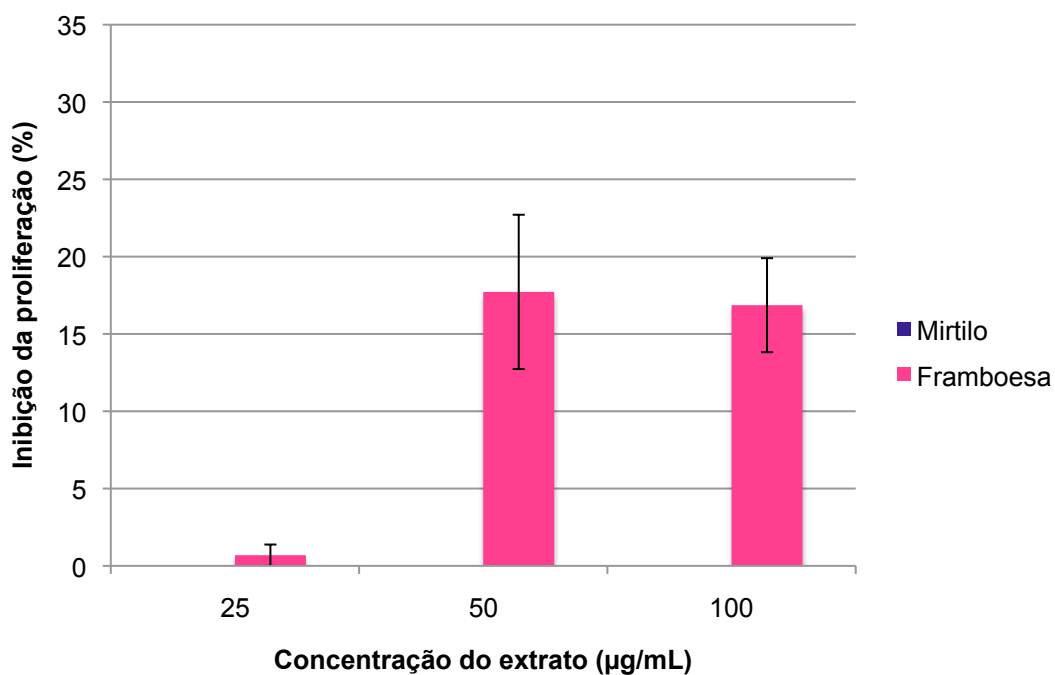
Ambos os extratos evidenciaram uma capacidade de inibição da proliferação da linha celular PC-3 (**Figura 16**). Apesar de não ter sido possível o cálculo do IC<sub>50</sub> para qualquer dos extratos, salientou-se um efeito dose-dependente do extrato de mirtilo, que inibiu 5% da proliferação a uma concentração de 25µg/mL e atingiu uma inibição superior a 20% a uma concentração de 100µg/mL, e um efeito mais pronunciado do extrato de framboesa sem, contudo, se verificar um efeito dose-dependente.

Relativamente à linha celular LNCaP, não se verificou inibição da proliferação pelo extrato de mirtilo, em qualquer concentração testada. O extrato de framboesa mostrou uma inibição superior a 15% a 100 e 50µg/mL (**Figura 17**).

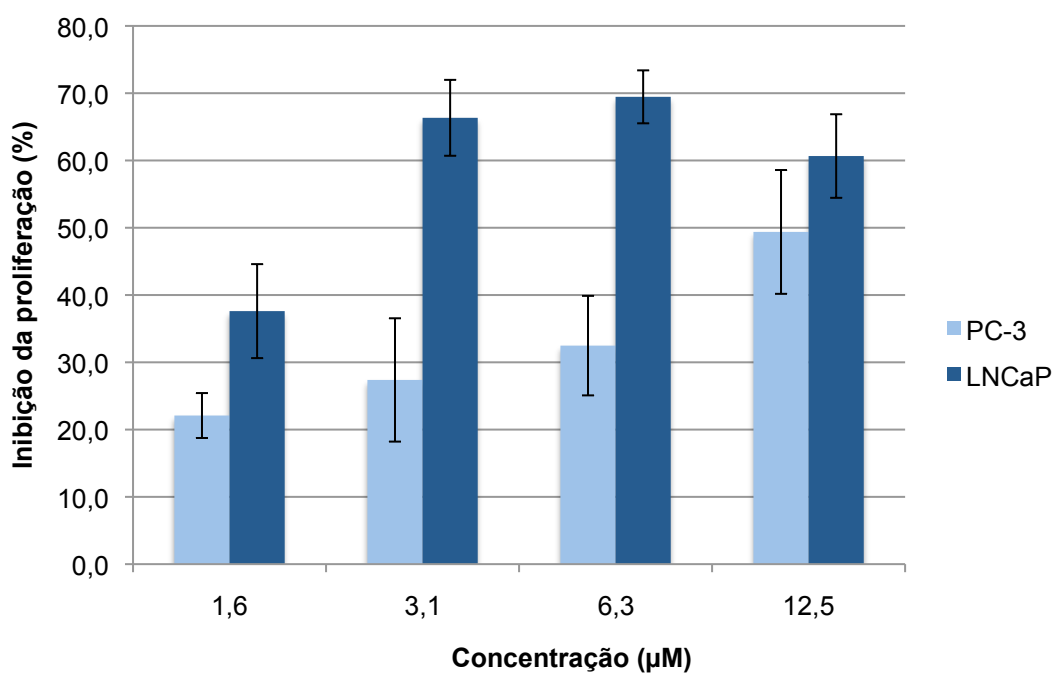
Relativamente ao efeito da doxorrubicina em ambas as linhas celulares, verificou-se uma inibição dose-dependente da proliferação das células PC-3 e uma menor sensibilidade desta linha celular a este composto, em comparação com a linha LNCaP (**Figura 18**).



**Figura 16:** Efeito inibitório dos extratos na proliferação de PC-3. Os resultados referem-se à média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.



**Figura 17:** Efeito inibitório dos extratos na proliferação de LNCaP. Os resultados referem-se à média  $\pm$  SEM de 2 experiências independentes, realizadas em duplicado.



**Figura 18:** Inibição da proliferação de PC-3 e LNCaP pela doxorubicina (controlo positivo). Os resultados referem-se à média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.



## V. Discussão

Os compostos fenólicos de bagas têm merecido a atenção de muitos investigadores nos últimos anos. Têm-lhes sido associados efeitos antimicrobianos (12), anti-inflamatórios (12, 16, 23), antioxidantes (8, 12, 16, 22, 23) e ainda antimutagénicos e antineoplásicos (10, 12, 16, 22, 23), entre outros.

Os polifenóis são os metabolitos secundários maioritários nas plantas (17). A sua concentração em bagas varia com aspetos internos, como as diferenças genéticas (a mais determinante) (43, 171), a espécie, os nutrientes e as hormonas (8, 19), mas também com aspetos ambientais como a região, a luz, a temperatura, o aporte de água e o tempo e condições de cultivo, colheita e armazenamento (8, 17, 172). Por conseguinte, pode inferir-se que bagas cultivadas em diferentes países, com condições climáticas diferentes, apresentarão teores distintos de compostos fenólicos. Por serem escassos os estudos que investigaram o teor de polifenóis e as atividades biológicas de bagas produzidas em Portugal, esse foi o objetivo do presente trabalho.

Relativamente ao mirtilo, os valores obtidos são ligeiramente inferiores aos descritos na literatura, com variações entre 27,4mg EAG/g (172) e 99,3mg EAG/g (173) de extrato liofilizado. Quando a quantificação se reporta a fruto em natureza, os valores oscilam entre 525,0mg/100g (8) e 525,0mg/g (12, 20, 174) e ainda entre 77mg e 820mg/100g de fruto para outras espécies do género *Vaccinium* (175-180). Comparando os valores obtidos com os de investigações feitas em Portugal, verifica-se uma similaridade dos teores de compostos fenólicos. Um estudo obteve teores entre 1,8mg e 4,3mg EAG/g de fruto e entre 1,3 e 1,6mg EAG/g de fruto, em extratos derivados de mirtilos provenientes de território português, preparados com metanol e com acetona, respetivamente (181). Outros estudos apresentaram valores entre 138 e 220mg EAG/100g de fruto fresco, em diferentes cultivares de mirtilo (182), e ainda entre 147 e 201mg EAG/100g de fruto (183). Assim, e reduzidos a uma mesma unidade de medida, pode concluir-se que os teores em polifenóis de mirtilos cultivados em Portugal são inferiores aos cultivados noutros países, pelo que se poderá inferir que as condições climáticas e o solo português, denominadores comuns, condicionam um mais baixo teor de polifenóis do mirtilo.

O extrato de framboesa analisado neste estudo apresenta um teor de compostos fenólicos semelhante ao obtido noutros estudos, nos quais se encontram valores a oscilar entre 10,5 e 98,5mg/g de peso seco (184-186). Sabe-se que num mesmo estudo, diversas variedades de framboesa podem justificar diferenças superiores a 100% no teor de polifenóis. Como exemplos, podem citar-se o estudo de Zhang e seus colaboradores, de 2013, com valores de 40,9 a 98,5mg/g de extrato (185), e o estudo de Pantelidis, de 2007, que reporta teores de compostos fenólicos entre 10,5

e 24,9mg/g de extrato (184). Nos estudos em que o teor de compostos fenólicos é calculado para o peso fresco, a framboesa apresenta valores de 114 a 715mg EAG/100g de fruto (8, 17, 38-41, 43, 174, 176, 187, 188), até 121mg/g (12, 20), sendo reportadas variações de 1,6 vezes entre genótipos (39).

Ao contrário do que foi revisto por Nile, em 2014, obteve-se neste trabalho uma maior concentração em compostos fenólicos no extrato de framboesa do que no de mirtilo (12).

O efeito antimicrobiano das bagas, nomeadamente da framboesa e do mirtilo, e dos seus compostos fenólicos, tem sido descrito.

Quanto ao efeito antibacteriano, um estudo de 2001 evidenciou uma forte inibição de bactérias Gram-negativo por parte de extratos de bagas, mas uma ausência de efeitos em bactérias Gram-positivo (189). Foi demonstrada uma leve inibição (zona de inibição > 1-3mm em relação ao metanol, controlo negativo) de *S. aureus* (DSM 20231) e de *E. coli* (ATCC 8739) por extratos de mirtilo e de framboesa a concentrações de 1mg/mL (93), e de *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) por extratos de mirtilo a 0,05g/mL (92). Pelo método de contagem em placa, dados indicam uma inibição dose-dependente de estirpes patogénicas de *S. aureus* por mirtilos e framboesas liofilizados (a 2 e 10mg/mL) (68). Um estudo do mesmo grupo avaliou a capacidade antimicrobiana de extratos derivados destas bagas, tendo observado uma inibição do crescimento de *E. coli* CM871 e de *E. coli* ATCC 17755 quando a concentração de extrato foi de 1mg/mL (189). Ainda a uma concentração de 1mg/mL, extratos de mirtilo e framboesa foram capazes de inibir *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. coli* (ATCC 17755) (190).

Como se verifica, a maioria dos autores investigou a atividade antimicrobiana do mirtilo e da framboesa e dos seus extratos recorrendo ao método de difusão em placa e ao método de contagem em placa, não havendo, do nosso conhecimento, estudos em que se tenha usado o método de microdiluição em caldo. Assim, e dadas as limitações de comparação com outros estudos, poder-se-á inferir como causa da ausência de efeito inibidor do crescimento de bactérias a baixa concentração de extrato usada nos ensaios. Como se pode verificar acima, outros grupos usaram concentrações 10 a 20 vezes superior às usadas no presente trabalho.

Relativamente à capacidade antifúngica, um estudo de 2000 evidenciou, pelo método de difusão em placa, uma leve inibição (zona de inibição 1-3mm maior que a zona de inibição do metanol) de extratos de mirtilo e framboesa, a 1mg/mL, em *C. albicans* (ATCC 10231) (93). Noutro estudo em que se usou o mesmo método, extratos de mirtilo, a 50mg/mL não mostraram efeito antifúngico para a maioria dos

fungos avaliados, exibindo apenas uma ligeira inibição (9,66mm de zona de inibição) em *C. parapsilosis* (92). Neste estudo, a ampla ocorrência de leveduras nas plantas e bagas foi apontada como possível causa da resistência dos fungos aos extratos (92). Um estudo mais recente investigou a capacidade de extratos de diferentes bagas inibirem *C. albicans* (NCPF 3179), a uma concentração de 1mg/mL, pelo método de contagem em placa. Verificou-se ausência de inibição por parte do extrato de mirtilo, e uma clara inibição por parte do extrato de framboesa, o que pode estar relacionado com a riqueza da framboesa em elagitaninos, principais compostos fenólicos das espécies do gênero *Rubus* (38, 190, 191). Os dados do presente trabalho corroboram este argumento, uma vez que, para uma mesma concentração de extrato, apenas o de framboesa mostrou capacidade de inibição de fungos, nomeadamente *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Contudo, deve ressaltar-se que a concentração do extrato de framboesa em compostos fenólicos foi superior à do extrato de mirtilo o que, por si só, poderá explicar esta diferença de resultados. Para confirmar o efeito dos elagitaninos em detrimento de outros polifenóis, teria sido necessária a quantificação deste composto fenólico.

Mais uma vez, a falta de estudos com metodologia equivalente ao presente, nomeadamente a utilização de outros métodos que não o método de microdiluição em caldo, limita as comparações dos nossos resultados com os de outros autores.

As concentrações usadas podem ser um ponto de discussão dos resultados. Para além das concentrações apresentadas acima ( $\geq 1$ mg/mL), um estudo português de 2015, que compilou dados de efeitos antifúngicos em espécies de *Candida*, apresentou CMI de diferentes compostos e plantas, sendo que a grande maioria se encontra na ordem dos mg/mL. A groselha negra, por exemplo, apresentou um CMI de 4,41mg/mL para *C. parapsilosis* (88).

O solvente usado para a preparação dos extratos é também um fator que influencia os resultados obtidos, uma vez que condiciona a composição final do extrato. O estudo anteriormente citado indica que, por exemplo, extratos metanólicos apresentam CMI mais baixos do que outros preparados com solventes diferentes (88), o que está de acordo com o presente estudo, uma vez que o extrato de framboesa, preparado com metanol e acetona, apresentou maior atividade nas concentrações testadas do que o de mirtilo, preparado com etanol e água.

O efeito imunomodulador dos extratos também foi alvo de estudo neste trabalho.

A modulação do sistema imune através da dieta é uma estratégia interessante pois, apesar de apresentar efeitos menos robustos que formulações farmacêuticas, apresenta menor toxicidade, sendo possível a hipótese de uma exposição sustentada a longo termo (192). Neste sentido, os compostos fenólicos têm



mostrado ser imunomoduladores, seja pela inibição da proliferação de células ou pelos seus efeitos anti-inflamatórios (12, 16, 23, 130, 193).

Alguns autores têm-se debruçado sobre os efeitos dos polifenóis no processo inflamatório. Verificou-se que estes compostos são capazes de influenciar a secreção de citocinas e muitas vias de sinalização essenciais para a função da célula (103). Por exemplo, foi demonstrado que polifenóis purificados de mirtilo, a concentrações de 10 a 200µg/mL, são capazes de inibir de forma significativa a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6 e IL-12) em macrófagos estimulados com LPS (103), e uma diminuição significativa dos níveis de mRNA de IL-1β e de TNF-α por antocianinas de mirtilo a uma concentração de 10µg/mL (194). Para além destes efeitos, a ação anti-inflamatória dos polifenóis também tem sido atribuída à sua capacidade antioxidante, nomeadamente por mecanismos de prevenção da formação de espécies reativas de oxigénio e azoto, como o NO (195-197), e de *scavenging* (103).

Para estudar a atividade anti-inflamatória dos extratos, selecionou-se o NO, conhecido marcador inflamatório. É produzido em macrófagos pela iNOS em resposta a uma exposição a citocinas, como o TNF-α, a IL-1 ou produtos microbianos como o LPS (103, 198), sendo este estímulo muito usado para investigar a capacidade anti-inflamatória de compostos (195).

No caso específico da inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7, são vários os estudos que investigaram o efeito de compostos fenólicos de origem sintética ou provenientes de plantas e frutos que não as bagas (199-201), sendo escassos os que usaram bagas ou polifenóis delas provenientes. Wang e seus colaboradores, em 2002, investigaram o efeito de vários compostos fenólicos derivados de bagas em inibir a produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e Interferão-gama (IFN-γ), a concentrações de 16 a 500µM. Verificou-se que a maioria dos compostos fenólicos foram capazes de inibir a produção de NO, especialmente as antocianinas, que mostraram um efeito dose-dependente, com valores de IC<sub>50</sub> de 250µM ou superiores, sem efeitos citotóxicos (202). Outro estudo mais recente mostrou que a concentrações não-tóxicas (150-200µg/mL), extratos de várias bagas, incluindo de framboesa, exibiram 20% a 25% de inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (195). Uma fração do extrato de framboesa rica em antocianinas mostrou ter um efeito inibidor significativo, com valores de inibição de 69,3% e 98,8% a 150 e 200µg/mL, respetivamente (195). Os dados do presente trabalho corroboram e superam estes resultados, uma vez que a uma concentração inferior (100µg/mL), o

extrato de framboesa, assim como o de mirtilo, inibiu a produção de NO em cerca de 80%, sem efeitos tóxicos.

O NO está envolvido na defesa e imunidade do hospedeiro e na modulação da resposta inflamatória. Para além das suas funções fisiológicas, uma produção excessiva de NO durante uma infeção leva muitas vezes a um dano celular e tecidual, especialmente ao sistema vascular (104, 105, 198, 202). Em casos de choque séptico, por exemplo, o NO está envolvido no colapso vascular, relacionado com a mortalidade destes doentes (203). Para além de ser um marcador inflamatório, o NO pertence ao grupo das espécies reativas de oxigénio e azoto (118, 204). Quando a quantidade de espécies reativas supera os níveis fisiológicos, entra-se em stress oxidativo (118), condição em que estas espécies podem reagir com proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, com efeitos deletérios, e que está incluída na patogénese de várias doenças como o cancro, as doenças cardiovasculares, a DM tipo 2 e a depressão (118, 121, 204). Para contrariar esta situação, o organismo dispõe de sistemas antioxidantes endógenos, que podem ser potenciados com o aporte exógeno de antioxidantes, a partir da dieta (118, 204). Os antioxidantes podem agir por inativação de espécies reativas (o chamado *scavenging*), inibição de enzimas produtoras de radicais livres, ativação de enzimas antioxidantes internas ou quelação de iões metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , que agravam o stress oxidativo (204). Pela toxicidade que muitos antioxidantes sintéticos apresentam, estes não devem ser usados farmacologicamente, pelo que é importante a pesquisa de compostos naturais que exerçam os mesmos efeitos antioxidantes sem consequências nefastas (204). Os polifenóis, presentes em bagas, têm sido reconhecidos como antioxidantes, podendo atuar como agentes redutores, dadores de átomos de hidrogénio, *scavengers* ou ainda quelantes de iões metálicos de transição (172). O seu teor em bagas está correlacionado com as propriedades antioxidantes, nomeadamente de *scavenging*, destes frutos (38, 43, 92).

Do nosso conhecimento, não existem na literatura estudos em que a capacidade de *scavenging* de extratos de bagas tenha sido avaliada recorrendo à reação de Griess. Na maioria dos trabalhos existentes é usado o método de *scavenging* do radical DPPH. Um estudo de 2014 investigou a capacidade de *scavenging* dos radicais DPPH e ABTS por extratos de mirtilo a 10, 50 e 500 µg/mL, obtendo resultados de 29,4%, 29,6% e 40,6% (para o DPPH) e 2,4%, 4,2% e 8,6% (para o ABTS) (172). Outro estudo apresentou o efeito de extratos de espécies do género *Vaccinium*, a uma concentração de 50 mg/mL, no *scavenging* do DPPH, com valores a variar entre 63,7 % e 82,1% (92). Pelo mesmo método, outro estudo indicou um  $\text{IC}_{50}$  de 0,70 e 0,80 mg/mL para extratos de mirtilo e framboesa, respetivamente (205). Ainda pelo

método do DPPH, um estudo de 2012 apresentou valores de inibição do radical de 41,5% a 82,4% por extratos de diversas variedades de framboesa a 0,1mg/mL (38), tendo encontrado uma forte correlação entre a capacidade de *scavenging* de radicais e o teor total de polifenóis, assim como entre a capacidade de *scavenging* de radicias e o teor de ácido elágico total em framboesas.

Já com uma metodologia diferente, um estudo feito em Portugal, em diferentes cultivares de mirtilo, obteve percentagens de sequestro do peróxido de hidrogénio de 10,7% a 22,5% e percentagens de sequestro do radical anião superóxido superiores a 90% (182).

A falta de estudos com a mesma metodologia para avaliação da capacidade antioxidante, nomeadamente de *scavenging*, de extratos de mirtilo e framboesa, impossibilita a comparação dos dados obtidos. Os mesmos permitem, contudo, concluir que a diminuição dos teores de NO não se deveu a um efeito de *scavenging* deste radical, mas terá antes sido consequência de uma diminuição da sua produção. A diminuição da produção de NO pode ser consequência de uma redução da expressão da iNOS ou de um comprometimento da atividade desta enzima. Alguns estudos têm evidenciado uma inibição da mesma por polifenóis (206-208) e, especificamente, por compostos fenólicos de bagas (110). Para esclarecer qual o mecanismo pelo qual a produção diminuiu, seriam necessários mais ensaios.

Para além de macrófagos de murino, também se usaram neste estudo macrófagos derivados de uma linha monocítica humana. Linhas celulares monocíticas são frequentemente usadas como modelo para o estudo da função de macrófagos (resposta e diferenciação) e da atividade anti-inflamatória de compostos (101, 197), uma vez que os macrófagos tecidulares não podem ser facilmente cultivados *ex vivo* (209). A linha celular THP-1 permite, com o agente diferenciador PMA, a obtenção de macrófagos derivados de THP-1 semelhantes aos macrófagos derivados de células mononucleares de sangue periférico (101, 209, 210). As células monocíticas podem ser estimuladas com vários compostos, como o LPS ou a PHA, o que vai condicionar o fenótipo dos macrófagos (163, 209, 210). O LPS leva a uma polarização dos macrófagos pela via clássica (M1), com consequente libertação de citocinas pró-inflamatórias (210), tal como acontece com a PHA, que induz uma produção de NO nestas células (211, 212).

Os resultados deste estudo permitiram concluir que ambos os extratos não são tóxicos para estas células, não se tendo encontrado na literatura estudos que tenham investigado este efeito.

A atividade imunomoduladora dos extratos foi ainda estudada em linfócitos T, principais mediadores das doenças mediadas pelo sistema imune, estando implicados em doenças como a artrite reumatóide, a psoríase ou a DM tipo 1 (127).

Não existem, do nosso conhecimento, estudos em que se tenha analisado o efeito de extratos de mirtilo ou framboesa na proliferação da linha celular Jurkat. Contudo, alguns compostos fenólicos, isoladamente, têm sido estudados neste sentido. O resveratrol, por exemplo, presente em uvas, ruibarbo e algumas bagas, apresentou um IC<sub>50</sub> de 42,6µM na inibição da proliferação de Jurkat (213). Um estudo posterior demonstrou a capacidade de extratos e de antocianinas derivadas de groselha negra em induzir a apoptose nestes linfócitos T, assim como a capacidade de redução significativa da viabilidade destas células pelo sumo de groselha negra a uma concentração de 30µL/mL e 50µL/mL (143).

Apesar de ténue, verificou-se, no presente estudo, uma inibição dose-dependente da proliferação destas células, pelo que se pode inferir um potencial efeito terapêutico de ambos os extratos em doenças como a artrite reumatóide, em que existe uma acumulação de macrófagos e linfócitos nas articulações (167).

A linha celular usada corresponde a uma linha de leucemia linfoblástica aguda (214), cancro hematológico mais comum em crianças, cuja taxa de cura é de cerca de 90%, mas de apenas 30 a 40% em adultos (143). Assim, a inibição da proliferação destas células também pode ser interpretada como um efeito anticancerígeno (215) dos extratos, já que a proliferação celular excessiva e descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos no processo neoplásico. Por forma a confirmar esta atividade seriam necessários mais estudos, nomeadamente para testar doses mais elevadas de extrato, assim como a toxicidade destes para as células.

Como já referido, o estudo da proliferação celular pode ser usado com o objetivo de testar a capacidade que um composto tem de inibir o crescimento de células tumorais (216), podendo assim inferir-se sobre a sua capacidade de supressão de formação de neoplasias.

Estudos *in vitro* têm evidenciado a capacidade dos compostos bioativos das bagas em reduzir a proliferação e induzir a apoptose em linhas celulares de cancro da próstata (144, 217, 218). Por forma a investigar a ação dos extratos de mirtilo e framboesa nestas células, usaram-se as linhas PC-3, hormono-resistente, e LNCaP, hormono-sensível.

Dados da literatura apontam para efeitos de bagas e compostos fenólicos na redução da proliferação de células PC-3. Verificou-se uma inibição dose-dependente por um sumo de framboesa clarificado, com um IC<sub>50</sub> de 20µL/mL (219). Um estudo

posterior mostrou também o efeito de um preparado contendo sumo concentrado de bagas tanto na redução do crescimento de células PC-3, como na diminuição do tamanho de tumores em ratinhos a quem foi administrada água com o mesmo preparado (148). Outros estudos reportaram o efeito de compostos fenólicos isolados na inibição do crescimento destas células, nomeadamente o ácido elágico, de uma maneira dose-dependente, com um IC<sub>50</sub> de 80µmol/L (144), e a delphinidina, também de uma forma dose-dependente, com um IC<sub>50</sub> de 90µmol/L (218).

Existe também literatura que descreve o efeito das bagas na proliferação da linha celular LNCaP. Um estudo de 2006, em que se testou o efeito de extratos de framboesa e de uma baga do género *Vaccinium*, enriquecidos em fenóis, na inibição da proliferação destas células, evidenciou um IC<sub>50</sub> de 100µg/mL ( $\pm 0,06$ ) e 36,45µg/mL ( $\pm 0,05$ ), respetivamente, assim como uma inibição dose-dependente (10). Um preparado contendo sumo concentrado de várias bagas causou também uma redução no crescimento destas células, assim como de tumores em ratinhos (148). Os efeitos de diversos polifenóis na proliferação desta linha celular foram estudados. O ácido tânico, a rutina, o ácido gálico, a murina, a quercetina e o resveratrol inibiram de forma significativa a proliferação celular (220), a delphinidina inibiu o crescimento celular de uma forma dose-dependente, com um IC<sub>50</sub> de 50µmol/L (218), e as proantocianidinas extraídas de espécies do género *Vaccinium*, a uma concentração de 20µg/mL, reduziram o crescimento para apenas 11% do controlo, com um IC<sub>50</sub> de 13,3µg/mL (146). Neste estudo verificou-se uma maior sensibilidade da linha celular sensível aos androgénios (LNCaP), em comparação com a linha insensível aos androgénios (DU145), relativamente à redução do crescimento induzida pelas frações do extrato (146).

Os efeitos indesejáveis das terapias antineoplásicas atuais, consequência da sua ação sobre células cancerígenas e normais, reforça a necessidade de pesquisa de compostos com maior especificidade para células cancerígenas. Por forma a esclarecer o potencial efeito terapêutico de extratos de framboesa e mirtilo, serão necessários mais estudos, nomeadamente para averiguar o efeito no tecido prostático normal e a capacidade de, para além de inibirem a proliferação de células cancerígenas, terem também efeitos citotóxicos.

Usaram-se neste estudo bagas produzidas em Portugal, previamente armazenadas durante vários meses a -18°C. No que diz respeito à temperatura, são vários os estudos que se têm debruçado sobre este tema, testando a perda de compostos fenólicos de bagas e produtos derivados, armazenados a diferentes temperaturas. Um estudo de 2003 demonstrou que o armazenamento de mirtilos a 5°C durante 35 dias não alterou o teor de polifenóis, de antocianinas, ou a capacidade antioxidante

(177). Contudo, outros estudos apontam para efeitos nefastos do armazenamento dos frutos na quantidade e atividade de polifenóis. A título de exemplo, foram demonstradas perdas significativas no teor total de polifenóis e de antocianinas de extratos de mirtilo armazenados em garrafas de vidro a temperaturas de 6°C, 23°C e 35°C, ao 30º dia (178), uma degradação de 59% das antocianinas presentes em mirtilos após 6 meses de armazenamento a -18°C (30) e uma diminuição de 23% e 34% na atividade antioxidante de mirtilos e framboesas, respetivamente, após 10 meses de congelação (174). Apesar de poder afetar o teor de polifenóis e as atividades biológicas destes, a congelação continua a ser o meio recomendado de armazenamento de bagas, por forma a reter os seus compostos bioativos (178). Note-se que as condições de armazenamento das bagas usadas neste estudo são apenas referidas como uma possível causa interferente no teor de compostos fenólicos. Para se poder concluir com certeza o efeito do armazenamento, deveriam ter-se testado bagas com a mesma proveniência não submetidas a estas condições de armazenamento, e confirmar a existência de diferenças.

Para além das condições de armazenamento, as diferenças no modo de preparação dos extratos constitui um fator que limita as comparações entre estudos. Nalguns casos, os extratos são purificados através de uma extração em fase sólida (SPE), por forma a remover compostos interferentes, como os açúcares (185), os ácidos e outros compostos solúveis (17), permitindo a obtenção de extratos mais concentrados e, por isso, mais ativos.

Como já referido, também o facto de serem escassos os estudos que tenham investigado bagas produzidas em Portugal constitui um entrave à comparação dos resultados obtidos, já que as condições climáticas e a região de cultivo são fatores que influenciam o teor de compostos fenólicos e, consequentemente, as atividades biológicas das bagas e seus compostos (8, 17, 172). Ainda em relação aos fatores que influenciam os teores de polifenóis das bagas, sabe-se que as diferenças genéticas e a espécie são fatores determinantes (43, 171). Convém pois referir que a denominação geral “mirtilo” engloba comumente a tradução dos termos em inglês “*bilberry*” e “*blueberry*”, que se referem a espécies diferentes. Aliás, o termo “*blueberry*” é genérico e engloba múltiplas espécies de mirtilo, ao passo que o termo “*bilberry*” se refere ao fruto da espécie *Vaccinium myrtillus*, também chamado de mirtilo europeu. Esta ressalva é importante já que, como revisto por Nile em 2014, o fruto “*blueberry*” (logo, um vasto número de espécies) pode conter entre 261 e 585mg de compostos fenólicos por cada grama, ao passo que o mirtilo europeu pode conter cerca de 525mg/g de peso fresco (12). Os mirtilos (assim como as framboesas) usados neste estudo foram adquiridos num mercado local em Portugal,

sem indicação clara da espécie. Uma vez que a espécie *Vaccinium myrtillus* é a mais comum neste país (221), assumiu-se ser essa a espécie de mirtilos usada, sendo os dados obtidos comparados, sempre que possível, com informação da literatura referente a esta espécie. Quando tal não foi possível (por ausência do estudo desta espécie ou por falta de identificação clara da espécie usada), as comparações foram feitas com outras espécies do género *Vaccinium*.

Todos estes fatores podem explicar a grande amplitude dos dados descritos na literatura, assim como as diferenças entre estes e os valores obtidos neste trabalho, nomeadamente em relação à concentração de compostos fenólicos. Uma vez que a concentração de compostos fenólicos condiciona as atividades biológicas dos extratos, estas são também indiretamente influenciadas.





## VI. Conclusão

Pretendeu-se com o presente estudo investigar os efeitos antimicrobianos, imunomoduladores e anticancerígenos de extratos de mirtilo e framboesa, tendo-se concluído que:

Relativamente à atividade antimicrobiana:

- Uma ausência de efeito antibacteriano para ambos os extratos;
- Um efeito antifúngico (fungistático) do extrato de framboesa para *C. albicans* e *C. parapsilosis*;

Quanto à atividade imunomoduladora:

- Uma inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7, com um  $IC_{50}$ , em  $\mu\text{g/mL}$ , de  $53,58 \pm 7,21$  para o extrato de mirtilo e de  $44,36 \pm 8,67$  para o de framboesa;
- Uma ausência de efeito *scavenger* do NO formado por macrófagos RAW 264.7;
- Uma ausência de efeito citotóxico em macrófagos RAW 264.7 e THP-1, estimulados com LPS ou PHA;
- Uma inibição dose-dependente da proliferação de linfócitos T para ambos os extratos;

Relativamente à atividade anticancerígena:

- Uma inibição da proliferação de PC-3 pelos extratos de mirtilo (de uma forma dose-dependente) e de framboesa;
- Uma inibição da proliferação de LNCaP pelo extrato de framboesa e uma ausência de efeito inibitório pelo extrato de mirtilo.

A título de conclusão final, o presente trabalho vem reforçar a ideia de que os compostos (fenólicos) presentes no mirtilo e na framboesa possuem propriedades anti-inflamatórias e uma potencial atividade anticancerígena em cancro de próstata, sendo necessários estudos mais aprofundados para esclarecer os efeitos na viabilidade destas células e as concentrações mais adequadas.

## VII. Referências bibliográficas

1. Vlsoli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res* 2000;47:419-25.
2. Vecchia CL, Altieri A, Tavani A. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur J Nutr* 2001;40:261-67.
3. Bazzano L, Serdula M, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5:492-99.
4. Yao L, Jiang Y, SHi J, Tomás-Barberán F, Datta N, Singanusong R, et al. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004;59:113-22.
5. Potter J. Vegetables, fruit, and cancer. *Lancet* 2005;366:527-30.
6. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:287-306.
7. Horn LV, McCoin M, Kris-Etherton P, Burke F, Carson J, Champagne C, et al. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease *J Am Diet Assoc* 2008;108(2):287-331.
8. Szadjek A, Borowska E. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review *Plant Foods Hum Nutr.* 2008;63:147-56.
9. Zhao Y. Berry fruit: Value-added products for health promotion. Raton FB, editor: CRC Press; 2007.
10. Seeram N, Adams L, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller H, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro *J Agric Food Chem.* 2006;54:9329-39.
11. VitaCberry: Angelini 2013. Available from: [http://www.angelini.pt/wps/wcm/connect/7aeb025e-2795-4b2a-ac36-db7678a57df1/AF\\_VitaCberry\\_info+signed.pdf?MOD=AJPERES&CONVERT\\_TO=url&CACHEID=7aeb025e-2795-4b2a-ac36-db7678a57df1](http://www.angelini.pt/wps/wcm/connect/7aeb025e-2795-4b2a-ac36-db7678a57df1/AF_VitaCberry_info+signed.pdf?MOD=AJPERES&CONVERT_TO=url&CACHEID=7aeb025e-2795-4b2a-ac36-db7678a57df1).
12. Nile S, Park S. Edible berries: bioactive components and their effect on human health *Nutrition* 2014;30:134-44.
13. Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Alakomi H-L, Oksman-Caldentey K-M. Bioactive berry compounds - novel tools against human pathogens *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67:8-18.
14. Cieslik E, Greda A, Adamus W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables *Food Chem.* 2004;94:135-42.
15. Paredes-López O, Cervantes-Ceja M, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. Berries: Improving Human Healthy and Healthy Aging, and Promoting Quality Life - A Review *Plant Foods Hum Nutr* 2010 (65):299-308.
16. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance *Int J Mol Sci* 2007;8:950-88.

17. Chen L, Xin X, Zhang H, Yuan Q. Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties *Journal of Functional Foods* 2013;5:508-15.
18. Bienvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J Food Sci.* 2004;69:FCT164-FCT9.
19. Kahkonen M, Hopia A, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity *J Agric Food Chem* 2001;49(4076-82).
20. Jimenez-Garcia S, Guevara-Gonzalez R, Miranda-Lopez R, Feregrino-Perez A, Torres-Pacheco I, Vazquez-Cruz M. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Res Int.* 2013;54:1195-207.
21. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
22. Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson J, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:675-83.
23. Wang L, Stoner G. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 2008;269(2):281-90.
24. Extratos vegetais *Food ingredients Brasil.* 2010;11:16-20.
25. Choi E, Park J, Yoon K, Bae S. Evaluation of the in vitro/in vivo potential of five berries (bilberry, blueberry, cranberry, elderberry, and raspberry ketones) commonly used as herbal supplements to inhibit uridine diphospho-glucuronosyltransferase. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:13-9.
26. INFARMED. Folheto Informativo DAFLON 2010.
27. Martins F, Pinho O, Ferreira I. Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação. *Alimentação Humana.* 2004;10(2):67-78.
28. Chu W-K, Cheung S, Lau R, Benzie I. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In: Benzie IFF W-GS, editor. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.* 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.
29. INE. Estatísticas Agrícolas: Lisboa; 2015.
30. Reque P, Steffens R, Jablonski A, Flôres S, Rios A, Jong E. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: anthocyanin stability and antioxidant activity. *J Food Comp Anal.* 2014;33:111-16.
31. Borowska J, Szajdek A. Antioxidant activity of berry fruits and beverages *Pol J Natur Sc.* 2003;14 521-8.

32. Prior R, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 1998;46:2686-93.
33. Zheng W, Wang S. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *J Agric Food Chem* 2003;51:502-9.
34. Seeram N. Berry Fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem* 2008;56:627-9.
35. Mirtilos preço. In: Mirtilo, editor. [www.plubee.com](http://www.plubee.com)
36. Byamukama R, Kiremire B, Andersen O, Steigen A. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. *J Food Compos Anal* 2005;18:599-605.
37. Agriminho. Agriminho [Internet]: Wordpress. 2016. Available from: <https://agriminho.wordpress.com/>.
38. Bobinaite R, Viskelis P, Venskutonis P. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars *Food Chem*. 2012;132:1495-501.
39. Mazur S, Nes A, Wold A, Remberg S, Aaby K. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons *Food Chem*. 2014;160:233-40.
40. Ancos B, González E, Cano M. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit *J Agric Food Chem*. 2000;48:4565-70.
41. Liu M, Li X, Weber C, Lee C, Brown J, Liu R. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries *J Agric Food Chem*. 2002;50:2926-30.
42. Weber C, Perkins-Veazie P, Moore P, Howard L. Variability of antioxidant content in raspberry germplasm. *Acta Hort* 2008 (777):493-8.
43. Anttonen M, Karjalainen R. Environmental and genetic variation on phenolic compounds in red raspberry *J Food Compos Anal* 2005 (18):759-69.
44. Raspberry-mix. In: L.) FRi, editor. [www.transitiontreemobile.org](http://www.transitiontreemobile.org)
45. WHO. Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance Geneva, Switzerland 2014.
46. WHO. Antimicrobial resistance 2015 [cited 2015].
47. Gyawali R, Ibrahim S. Natural products as antimicrobial agents *Food Control*. 2014;46:412-29.
48. Stojkovic D, Petrovic J, Sokovic M, Glamoclija J, Kukic-Markovic J, Petrovic S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems *J Sci Food Agric* 2013;93:3205-08.

49. Sousa J, Peixe L. Antibióticos antibacterianos. In: LIDEL, editor. Microbiologia. Lisboa2010. p. 453-69.
50. Tenover F. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria Am J Infect Control 2006;34:S3-S10.
51. Jassmin S, Limoges R. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages "The Living Drugs". World J Microbiol Biotechnol. 2014;30(8):2153-70.
52. Xiong M-H, Bao Y, Yang X-Z, Zhu Y-H, Wang J. Delivery of antibiotics with polymeric particles Adv Drug Deliv Rev. 2014;78:63-76.
53. The dangers of hubris on human health 2013.
54. Luhachack L, Nudler E. Bacterial gasotransmitters: an innate defense against antibiotics Curr Opin Microbiol 2014;21:13-7.
55. Meek R, Vyas H, Piddock L. Nonmedical uses of antibiotics: time to restrict their use? PLoS Biol. 2015;13(10).
56. WHO. Antimicrobial resistance - Global Report on surveillance 2014. 2014.
57. Brooks B, Brooks A. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. Adv Drug Deliv Rev. 2014;78:14-27.
58. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12.
59. Bhalodia N, Shukla V. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant J Adv Pharm Technol Res 2011;2(2):104-9.
60. Ng V, Chan J, Sardon H, Ono R, García J, Yang Y, et al. Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections Adv Drug Deliv Rev 2014;78:46-62.
61. Yang Y. Emergence of multidrug-resistant bacteria: important role of macromolecules and drug delivery systems Adv Drug Deliv Rev 2014;78:1-2
62. NIAID. *Escherichia coli*. [www.microbiologypictures.com](http://www.microbiologypictures.com).
63. Issler-Fisher A, McKew G, Fisher O, Harish V, Gottlieb T, Maitz P. Risk factors for, and the effect of MRSA colonization on the clinical outcomes of severely burnt patients. Burns. 2015;41:1212-120.
64. Carr J. *S. aureus* In: aureus S, editor. PHIL CDC.
65. Andonova M, Urumova V. Immune surveillance mechanisms of the skin against infection strategy of *Pseudomonas aeruginosa*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2013;36(5):433-48.
66. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets Biologicals 2014;42(1):1-7.
67. Janice H. *Pseudomonas aeruginosa*. In: bacteria SoPa, editor. [www.microbiologypictures.com](http://www.microbiologypictures.com)

68. Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kahkonen M, Heinonen M, Maatta-Riihinen K, et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens J Appl Microbiol 2005;98:991-1000.
69. Whibley N, Gaffen S. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans Candida* species. Cytokine. 2015;76:42-52.
70. Underhill D, Iliev I. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system Nat Rev Immunol 2014;14(6):405-16.
71. Liu S, Hou Y, Chen S, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery Int J Antimicrob Ag. 2014;43:395-402.
72. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett R. Emerging and emerged pathogenic *Candida* Species: beyond the *Candida albicans* paradigm. PLoS Pathog. 2013;9(9).
73. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia Clin Microbiol Infect 2014;20(6):5-10.
74. Sparber F, LeibundGut-Landmann S. Interleukin 17-mediated host defense against *Candida albicans* Pathogens. 2015;4(3):606-19.
75. Merseguet K, Nishikaku A, Rodrigues A, Padovan A, Ferreira R, Melo A, et al. Genetic diversity of medically important and emerging species causing invasive infection BMC Infect Dis 2015;15:57.
76. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63.
77. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Prestler E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms Mycoses. 2012;55:199-204.
78. Chang T, Ho M, Yang Y, Lo P, Lin P, Wang A, et al. Distribution and drug susceptibilities of *Candida* species causing candidemia from a medical center in central Taiwan J Infect Chemother. 2013;19(6):1065-71.
79. Hernández-Santos N, Gaffen S. Th17 cells in immunity to *Candida albicans* Cell Host Microbe. 2012;11(5):425-35.
80. Hans N. Colonies of *Candida albicans* on Sabouraud agar. In: *albicans C*, editor. microbiologypictures.
81. Ricardo E, Miranda I, Faria-Ramos I, Silva R, Rodrigues A, Pina-Vaz C. In vivo and in vitro acquisition of resistance to Voriconazole by *Candida krusei* Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(8):4604-11.
82. Schuster M, Meibohm A, Lloyd L, Strom B. Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: a matched, case-control study. J Infect 2013;66:278-84.
83. Hardy-Diagnostics. *Candida krusei* colonies growing on HardyCHROM *Candida*. In: *krusei C*, editor. 2016



84. Oliveira M, Specian A, Andrade C, França E, Furlaneto-Maia L, Furlaneto M. Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. *Micron*. 2010;41:604-8.
85. Lin C, Liu C, Hsieh F, Lee C, Wang W. Antimicrobial susceptibility and clinical outcomes of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015;48(5):552-8.
86. Pfaller M, Diekema D, Jones R, Sader H, Fluit A, Hollis R, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3254-9.
87. Hans N. Colonies of *Candida albicans* and *C. parapsilosis* on Sabouraud agar. In: *parapsilosis C*, editor. *microbiologypictures*.
88. Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira I. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Ind Crop Prod*. 2015;74:648-70.
89. Lee Y, Najm W, Owens J, Thrupp L, Baron S, Shanbrim E, et al. Anti-microbial activity of urine after ingestion of cranberry: a pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2010;7(2):227-32.
90. Ermis E, Hertel C, Schneider C, Carle R, Stintzing F, Schmidt H. Characterization of in vitro antifungal activities of small and American cranberry (*Vaccinium oxycoccos* L. and *V. macrocarpon* Aiton) and lignonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) concentrates in sugar reduced fruit spreads. *Int J Food Microbiol*. 2015;2014:111-17.
91. Rane H, Bernardo S, Howell A, Lee S. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence- specific mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:428-36.
92. Burdulis D, Sarkinas A, Jasutienė I, Stackeviciene E, Nikolajevs L, Janulis V. Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits *Acta Pol Pharm* 2009;66(4):399-408.
93. Rauha J, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kakhonen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 2000;56:3-12.
94. Chaplin D. Overview of the immune response *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):S3-S23.
95. Narendra B, Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double edged sword in cancer *Inflamm Res*. 2013;62:823-34.
96. Turvey S, Broide D. Innate immunity *J Allergy Clin Immunol*. 2009;125(2):S24-S32.

97. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Innate Immunity. In: Science G, editor. *Molecular Biology of the cell*. 4th ed. New York 2002.
98. Machado P, Carvalho L, Araújo M, Carvalho E. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An bras Dermatol*. 2004;79(6):647-64.
99. NIAID. Features of an immune response 2014 [cited 2016]. Available from: <https://www.niaid.nih.gov/topics/immuneSystem/Pages/features.aspx>.
100. Parham P. Elements of the immune system and their roles in defense. In: Science G, editor. *The immune system* 4th ed. New York 2014.
101. Chanput W, Mes J, Wichers H. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach *Int Immunol*. 2014;23(1):37-45.
102. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in tumor microenvironment *Cancers*. 2014;6:1670-90.
103. Cheng A, Yan H, Han C, Wang W, Tian Y, Chen X. Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Int J Biol Macromol* 2014;69:382-7.
104. Murray P, Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets *Nat Rev Immunol*. 2012;11(11):723-37.
105. Lu G, Zhang R, Geng S, Peng L, Jayaraman P, Chen C, et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat Commun*. 2015;6:1-14.
106. Fang F, Vazquez-Torres A. Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L941-3.
107. Gross S, Wolin M. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms *Annu Rev Physiol*. 1995;57:737-69.
108. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di-Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*. 2007;43(4):394-405.
109. Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, Gadgil A, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review *World J Surg Oncol* 2013;11:118.
110. Lau F, Joseph J, McDonald J, Kalt W. Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Journal Funct Foods* 2009;1:274-83.
111. Nahar P, Driscoll M, Li L, Slitt A, Seeram N. Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages *J Funct Foods* 2014;6:126-36.
112. Morgan M, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res* 2011;21:103-15.

113. Park E, Lee S, Lee J, Kim J. Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- $\kappa$ B. *J Funct Foods* 2013;5(1):178-86.
114. Okin D, Medzhitoc R. Evolution of inflammatory diseases *Curr Biol*. 2012;22(17):R733-R40.
115. Vesely M, Kershaw M, Schreiber R, Smyth M. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
116. Mortensen A, Sorensen I, Wilde C, Dragoni S, Mullerova D, Toussaint O, et al. Biological models for phytochemical research: from cell to human organism *Br J Nutr* 2008;99:ES118-ES26.
117. Liang Y, Huang Y, Tsai S, Lin-Shiau S, Che C, Lin J. Supression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*. 1999;20(10):1945-52.
118. Maurya P, Noto C, Rizzo L, Rios A, Nunes S, Barbosa D, et al. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging major deprssive disorder *Prof Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;65:134-44.
119. Ogawa K, Sakakibara H, Iwata R, Ishii T, Sato T, Goda T, et al. Anthocyanin composition and antioxidant activity of the crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries *J Agric Food Chem*. 2008;56:4457-62.
120. Zhang G, Liang Y, Zhu J, Jia Q, Gan W, Sun L, et al. Oxidative stress-mediated antiproliferative effects of furan-containing sulfur flavors in human leukemia Jurkat cells. *Food Chem*. 2015;180:1-8.
121. Moylan S, Berk M, Dean O, Samuni Y, Williams L, O'Neil A, et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;45:46-62.
122. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007;401:1-11.
123. Rapozzi V, Pietra E, Bonavida B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance of photodynamic therapy. *Redox Biol* 2015;6:311-17.
124. Alberts B, Johnson A, Lewis L, Raff M, Roberts K, Walter P. The Adaptive Immune System. In: Science G, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York 2002.
125. Patil U, Jaydeokar A, Bandawane D. Immunomodulators: a pharmacological review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4(1):30-6.
126. Smeets R, Fleuren W, He X, Vink P, Wijnands F, Gorecka M, et al. Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways: Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR and CD28-mediated signaling. *BMC Immunol*. 2012;13(12):1-17.
127. Abdoul-Azize S, Bendahmane M, Hichami A, Dramane G, Simonin A, Benammar C, et al. Effects of *Zizyphus lotus* L. (Desf.) polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *Int Immunopharmacol*. 2013;15:364-71.

128. DeJaco C, Duffner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2005;117(289-300).
129. Lorenzi J, orenzi V, Zanette D. Linfócitos T CD4+ e a resposta imune. *Scire Salutis*. 2012;2(1):5-9.
130. Alamgir M, Uddin S. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents. In: Chattopadhyay D, editor. *Ethnomedicine: a source of complementary therapeutics* 2010. p. 227-44.
131. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108
132. Organization WH. Cancer 2015 [08-10-2015]. Available from: <http://www.who.int/cancer/about/facts/en/>.
133. León-González A, Auger C, Schini-Kerth V. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy *Biochem Pharmacol*. 2015;98:371-80.
134. Van't-Veer P, Jansen M, Klerk M, Kok F. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease *Public Health Nutr* 2000;3(1):103-7.
135. Zunino S, Zhang Y, Seeram N, Storms D. Berry fruit extracts inhibit growth and induce apoptosis of high-risk acute lymphoblastic leukemia cells in vitro *J Funct Foods*. 2010;2:187-95.
136. Seeram N, Heber D. Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation Oxford 2006.
137. Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins *J Agric Food Chem* 2003;51:68-75.
138. Sun J, Liu R. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2006;241:124-34.
139. Ramos S, Alía M, Bravo L, Goya L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem*. 2005;53(4):1271-80.
140. Heo H, Lee C. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1984-9.
141. Wang S, Meckling K, Marcone M, Kakuda Y, Tsao R. Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? *Food Res Int* 2011;44:2545-54.
142. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europa: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.

143. León-González A, Sharif T, Kayali A, Abbas M, Dandache I, Etienne-Selloum N, et al. Delphinidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-O-rutinoside mediate the redox-sensitive caspase 3-related pro-apoptotic effect of blackcurrant juice on leukaemia Jurkat cells. *J Funct Foods*. 2015;17:847-56.
144. Malik A, Afaq S, Shahid M, Akhtar K, Assiri A. Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: A caspase-dependent pathway. *APJTM*. 2011:550-5.
145. Agarwal C, Singh R, Agarwal R. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis* 2002;23(11):1869-76.
146. Schmidt B, Jr JE, Lila M. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines *Cancer Lett*. 2006;231:240-6.
147. de-Brot S, Ntekim A, Cardenas R, James V, Allegrucci C, Heery D, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor in prostate cancer *Endocr Relat Cancer* 2015;22(3):R107-23.
148. Singh J, Yao M, Jardine G, Dong Q. A dietary phytochemical cocktail impedes prostate cancer growth in vitro and in vivo. 2008.
149. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventós R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods Enzymol*. 1999;299:152-78.
150. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. ed: Approved standard 2008.
151. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 2008.
152. Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gobencardo M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;45(3):203-6.
153. Cavaleiro C, Salgueiro L, Gonçalves M, Hrimpeng K, Pinto J, Pinto E. Antifungal activity of the essential oil of *Angelica major* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Nat Med*. 2015;69:241-8.
154. Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J, Tannenbaum S. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal biochem*. 1982;126:131-8.
155. Teixeira M, Cerqueira F, Barbosa C, Nascimento M, Pinto M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *J Drug Target*. 2005;13(2):129-35.

156. Cerqueira F, Cidade H, Ufford Lv, Beukelman C, Kijjoa A, Nascimento M. The natural prenylated flavone artelastin is an inhibitor of ROS and NO production *Int Immunopharmacol*. 2008;8:597-602.
157. Chen Y, Shem S, Lee W, Hou W, Wang L, Lee T. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem*. 2001;82(4):537-48.
158. Korhonen R, Lahti A, Hamalainen M, Kankaanranta H, Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol*. 2002;62(3):698-704.
159. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
160. Riss T, Moravec R, Niles A, Benink H, Worzella T, Minor L. Cell viability assays. 2015. In: *Assay Guidance Manual* [Internet].
161. Rogero S, Lugão A, Ikeda T, Cruz A. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res*. 2003;6(3):317-20.
162. Stockert J, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin R, Villanueva A. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*. 2012;114(8):785-96.
163. Singh U, Tabibian J, Venugopal S, Devaraj S, Jialal I. Development of an In vitro screening assay to test the antiinflammatory properties of dietary supplements and pharmacologic agents *Clin Chem*. 2005;51(12):2252-56.
164. Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma *Int J Cancer*. 1977;19(5):621-6.
165. Azad N, LaPaglia N, Kirsteins L, Uddin S, Steiner J, Williams D, et al. Jurkat cell proliferative activity is increased by luteinizing hormone-releasing hormone. *J Endocrinol*. 1997;153(2):241-9.
166. Walsh C, Leggett S, Strohschein K, Pierce R, Sleasman J. Effects of in vitro brevetoxin exposure on apoptosis and cellular metabolism in a leukemic T cell line (Jurkat). *Mar Drugs*. 2008;6(2):291-307.
167. Wang H, Wang Y, Jiang X, Wang Z, Zhong B, Fang Y. The molecular mechanism of curcumin on inducing cell growth arrest and apoptosis in Jurkat cells, a model of CD4+ T cells. *Int Immunopharmacol*. 2014;21:375-82.
168. Kaighn M, Narayan K, Ohnuki Y, Lechner J, Jones L. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*. 1979;17(1):16-23.

169. Horoszewicz J, Leong S, Kawinski E, Karr J, Rosenthal H, Chu T, et al. LNCaP model of human prostatic carcinomas. *Cancer Res* 1983;43(4):1809-18.
170. Lay M, Karsani S, Banisalam B, Mohajer S, Malek S. Antioxidants, phytochemicals, and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Seeds. *BioMed Res Int*. 2014;1-13.
171. Reyes-Carmona J, Yousef G, Martínez-Peniche R, Lila M. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J Food Sci*. 2005;70(7):s497-s503.
172. Hwang S, Yoon W, Lee O, Cha S, Kim J. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea *Food Chem*. 2014;146:71-7.
173. Vucic D, Petkovic M, Rodic-Grabovac B, Stefanovic O, Vasic S, Comic L. Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7(45):5130-6.
174. Poiana M, Moigradean D, Raba D, Alda L, Popa M. The effect of long-term frozen storage on the nutraceutical compounds, antioxidant properties and color indices of different kinds of berries *J Food Agric Environ*. 2010;8(1):54-8.
175. Koca I, Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey *Sci Hortic*. 2009;121:447-50.
176. Souza V, Pereira P, Silva T, Lima L, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of brazilian blackberry, red raspberry, strawberry and sweet cherry fruits *Food Chem* 2014;156:362-68.
177. Zheng Y, Wang C, Wang S, Zheng W. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 2003;51(24):7162-9.
178. Srivastava A, Akoh C, Fischer J, Krewer G. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *J Agric Food Chem*. 2007;55(7):2705-13.
179. Moyer R, Hummer K, Finn C, Frei B, Wrolstad R. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J Agric Food Chem*. 2002;50:519-25.
180. Sellappan S, Akoh C, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem* 2002;50:2432-38.
181. Matos S, Guiné R, Gonçalves F, Teixeira D. Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante em mirtilos de diferentes proveniências geográficas In: Química SPd, editor. 12º Encontro de Química dos Alimentos; Instituto Superior de Agronomia 2014. p. 332-5.

182. Rasteiro E. Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp, do grupo "Southern Highbush", produzidas em Portugal: Universidade Nova de Lisboa 2012.
183. Carreira S. Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares *Vaccinium* spp.: Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O'Neal, produzidas na Sub-região do Baixo Vouga: Universidade Nova de Lisboa; 2012.
184. Pantelidis G, Vasilakakis M, Manganaris G, Diamantidis G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 2007;102:777-83.
185. Zhang L, Li J, Hogan S, Chung H, Welbaum G, Zhou K. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition *Food Chem.* 2010;119:592-99.
186. Novakovic M, Stevanovic S, Gorjanovic S, Jovanovic P, Tesevic V, Jankovic M, et al. Changes of hydrogen peroxide and radical-scavenging activity of raspberry during osmotic, convective, and freeze-drying. *J Food Sci* 2011;76(4).
187. Çekiç Ç, Ozgen M. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *J Food Comp Anal.* 2010;23:540-44.
188. Tosun M, Ercisli S, Karlidag H, Sengul M. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their psysicochemical properties. *J Food Sci.* 2009;74(7).
189. Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hopia A, et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries *J Appl Microbiol.* 2001;90:494-507.
190. Nohynek L, Alakomi H, Kahkonen M, Heinonen M, helander i, Oksman-Caldentey K-M, et al. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens *Nutr Cancer* 2006;54(1):18-32
191. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents *Curr Opin Biotech* 2012;23:174-81.
192. Wong C, Nguyen L, Noh S, Bray T, Bruno R, Ho E. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunol Lett.* 2011;139(1-2):7-13.
193. Wagner H. Immunomodulatory agents from plants: Birkhauser Verlag 1999.
194. Lee S, Kim B, Yang Y, Pham T, Park Y, Manatou J, et al. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophage by inhibiting nuclear translocation of NF-kB independent of NRF2-mediated mechanism. *J Nutr Biochem.* 2014;25(4):404-11.
195. Li L, Wang L, Wu Z, Yao L, Wu Y, Huang L, et al. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis *Sci Rep.* 2014;4:6234.



196. Wang H, Nair M, Strasburg G, Chang Y, Booren A, Gray J, et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod* 1999;62:294-96.
197. Essafi-Benkhadir K, Refai A, Riahi I, Fattouch S, Karoui H, Essafi M. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF- $\kappa$ B, p38MAPK and Akt inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418:180-85.
198. Chi D, Qui M, Krishnaswamy G, Li C, Stone W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines Nitric oxide. 2003;8(2):127-32.
199. Nesuta O, López-Abán J, Shariati F, Yepes E, Navrátilová A, Smejkal K, et al. Polyphenols as inhibitors of NO production in LPS-stimulated rat macrophages. *Journal of Natural Pharmaceuticals*. 2011;2(1):1-6.
200. Kim H, Cheon B, Kim Y, Kim S, Kim H. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Mol Cell Pharmacol*. 1999;58(1):759-65.
201. Król W, Czuba Z, Threadgill M, BDMCunningham, Pietsz G. Inhibition of nitric oxide (NO.) production in murine macrophages by flavones. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(7):1031-35.
202. Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS-IFN- $\gamma$ -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*. 2002;50:850-7.
203. Titheradge M. Nitric oxide in septic shock. *Biochem Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):437-55.
204. Lu J, Lin P, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):840-60.
205. Hangun-Balkir Y, McKenney M. Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *Green Chem Lett Rev*. 2012;5(2):147-53.
206. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg V, Haqqi T. Green tea polyphenol apigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 $\beta$ -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(8):1097-105.
207. Tan A, Hou D, Konczak I, Tanigawa S, Ramzan I, Sze D. Native Australian fruit polyphenols inhibit COX-2 and iNOS expression in LPS-activated murine macrophages. *Food Res Int*. 2011;44(7):2362-67.
208. Guo Y, Sakulnarmrat K, Konczak I. Anti-inflammatory potential of native Australian herbs polyphenols. *Toxicol Rep*. 2014;1:385-90.

209. Daigneault M, Preston J, Marriott H, Whyte M, Dockrell D. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages PLoS One. 2010;5(1):1-10.
210. Freytes D, Kang J, Marcos-Campos I, Vunjak-Novakovic G. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2013;114:220-9.
211. Kim Y, So H, Youn M, Kim H, Woo W, Shin S, et al. Anti-inflammatory effect of Sasim extracts in PHA-stimulated THP-1 and peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. J Ethnopharmacol. 2007;112(1):32-9.
212. Keshewani V, Sodhi A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, phytohemagglutinin and wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxide. Nitric Oxide. 2007;16:294-305.
213. Barjot C, Toumaire M, Castagnino C, Vigor C, Vercauteren J, Rossi J. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. Life Sci. 2007;81:1565-74.
214. Arababadi M, Asadikaram G. Opium induces apoptosis in Jurkat cells via promotion of pro-apoptotic and inhibition of anti-apoptotic molecules. Iran J Basic Med Sci. 2016;19(2):215-20.
215. Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, et al. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. J Nat Med. 2011;65:651-55.
216. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia Molecular da Célula 4ed. Porto Alegre: Artmed 2005.
217. Thomasset S, Teller N, Cai H, Marko D, Berry D, Steward W, et al. Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? Cancer Chemother Pharmacol. 2009;64:201-11.
218. Hafeez B, Siddiqui I, Asim M, Malik A, Afaq F, Adhami V, et al. A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor-kB signaling. Cancer Res. 2008;68(20):8564-72.
219. Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice Anticancer Res 2007;27(2):937-48.
220. Ferruelo A, Romero I, Cabrera P, Arance I, Andrés G, Angulo J. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on the proliferation, apoptosis and androgen receptor expression in LNCaP cells. Actas Urol Esp. 2014;38(6):397-404.
221. Fonseca L, Oliveira P. A planta de mirtilo - morfologia e fisiologia Divulgação Agro 556 [Internet]. 2007.

## Errata

DIAS, Katy Esteves. **Avaliação da atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e de framboesa** – Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2016.

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
vii	15	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	Tabela 1	Mirtilo ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	Mirtilo europeu ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.)
8	10	que são também são resistentes	são também resistentes
24	12	imunossupressão	imunossupressão
28	4	Quantificar o teor de compostos fenólicos totais;	Avaliar a capacidade antimicrobiana, nomeadamente:
28	Entre 3 e 4	-	1. Quantificar o teor de compostos fenólicos totais;
35	3	leucemia monocítica humana	leucemia monocítica aguda
41	2	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> , podendo concluir-se que a CML do extrato de framboesa para estas leveduras foi >100µg/mL.